



## **HOOFSTUK 4**

### **MATERIAAL EN METODEDES**

## 4.1. MEDIA EN REAGENSE

### 4.1.1 Ammoniumchloried-oplossing (0.83%)

8.3 g ammoniumchloried (Merck, Darmstadt, Germany)

1 g natriumbikarbonaat (Merck)

74 mg etileendiamientetra-asynsuur (EDTA) (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA)

gedeïoniseerde water

### 4.1.2 3-[4,5-Dimetieltiazool-2-iel]-2,5-difeniel-tetrazolium bromied (MTT) oplossing

150 mg MTT-poeier (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA) is in 30 ml fosfaat gebufferde sout-oplossing (FBS) (sien 4.1.5) opgelos. Die finale konsentrasie van hierdie oplossing was 5 mg/ml.

### 4.1.3 Dulbecco se fosfaat gebufferde sout-oplossing (Dulbecco's FBS)

Dulbecco's FBS sonder  $Mg^{2+}$  of  $Ca^{2+}$  (BBL Microbiology Systems, Becton Dickenson and Company, VSA)

1% hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (Delta Bioproducts, Kempton Park SA)

0.09% natrium asied (Saarchem-Holpro Analytics [Pty] Ltd)

Filtreer met 'n 0.2  $\mu$ m porie membraan

Stoor by 4<sup>0</sup>C

### 4.1.4 Fetale kalfserum (FKS) gesupplementeerde RPMI 1640 medium

RPMI 1640 weefselkultuur medium (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland) is met die volgende hoeveelheid antibiotikum (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland) en hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (Delta Bioproducts, Kempton Park SA)

gesupplementeer:

445 ml RPMI 1640 medium

5 ml antibiotikum (10 000 U penisillien/ml en 10 000  $\mu$ g streptomisien/ml)

50 ml hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (HI FKS) (sien 4.1.8)

#### 4.1.5 Fosfaat gebufferde sout-oplossing (FBS)

Die gedehidreerde FTA-buffer van BBL (BBL Microbiology Systems, Becton Dickenson and Company, VSA) is volgens die voorskrif van die vervaardigers gemaak.

#### 4.1.6 Hanks se gebalanseerde sout-oplossing (HBSO)

Kleurstofvrye HBSO (pH 7.4) is van 'n kommersiële bron [Highveld Biologicals (Pty) Ltd, Johannesburg, SA] verkry.

#### 4.1.7 Heparien-oplossing

'n Oplossing van 500 eenhede heparien (sonder preserveermiddels) (Sigma) per ml is berei en deur filtrasie gesteriliseer. Van hierdie oplossing is 0.1 ml by elke 10 ml pas getapte bloed gevoeg om stolling te voorkom.

#### 4.1.8 Hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (HI FKS)

Fetale kalfserum (Delta Bioproducts, Kemptonpark, SA) is vir 45 minute by 56°C geïnkubeer.

#### 4.1.9 Sephadex voorbereiding

Vyftig milliliter (50 ml) HBSO [Highveld Biological (Pty) Ltd] is met 0.5% menslike albumien (Sigma) gesupplementeer. By 10 ml van laasgenoemde medium, bevattende kalsium, is 1.5 g Sephadex G15 krale (Sigma) gevoeg wat vir 15 min toegelaat is om te swel. Na spontane sedimentasie van die krale is die bostand versigtig afgegooi en 10 ml vars mensserum daarby gevoeg waarna dit vir 25 minute by 37°C geroteer is. Die geöpsoneerde krale is daarna drie maal gewas en in 10 ml inkubasie medium gehersuspendeer, verdeel in 3 ml hoeveelhede en by -70°C gevries.

#### 4.1.10 Stop-oplossing (vir die bepaling van neutrofielvashegting)

28 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [Saarchem-Holpro Analytics (Pty) Ltd, Krugersdorp, SA](1 mol/L)  
1 L gedistilleerde water

#### 4.1.11 Substraat-oplossing (o-Fenileendiamien)(OPD)

A) *Sitraat-fosfaat buffer:*

1) Sitroensuur [Saarchem-Holpro Analytics (Pty) Ltd] (35 mmol/L) 6.724 g

2) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Saarchem-Holpro Analytics (Pty) Ltd] (67 mmol/L) 9.514 g

Meng as volg:

Weeg reagentse 1) en 2) af en los elkeen afsonderlik op in 400 ml gedistilleerde water.

Voeg reagentse 2) bietjie vir bietjie by reagentse 1) terwyl die mengsel voortdurend geroer en ge-pH word. Die pH van die mengsel moet uiteindelik 5 wees waarna dit met gedistilleerde water na 1 L opgemaak word.

B) *Triton X-100 (Sigma)(0.1%)*

1 ml Triton X-100

C) *o-Fenileendiamien (OPD) (Sigma)*

1 g

D) *Waterstofperoksied (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

400 µl

Meng A + B + C + D saam en stoor in die donker.

#### 4.1.12 Suur Sitraat Dekstrose (“Acid Citrate Dextrose”)

Die volgende reagentse is in 1L gedeïoniseerde water opgelos:

24.5 g Anhidriese dekstrose

8.0 g Sitroensuur

22.0 g Trinatrium sitraat

#### 4.1.13 Toets buffer (vir die bepaling van neutrofielvashegting)

8.1816 g NaCl (Labchem Ltd)

0.3728 g KCl (Saarchem-Holpro Analytics Ltd)

0.2033 g MgCl (Saarchem-Holpro Analytics Ltd)

0.1110 g/L CaCl (BDH Ltd Poole England)

0.50445 g/L Glukose (BDH Ltd Poole Engeland)

2.383 g/L HEPES (Sigma)

30 mg menslike serumalbumien (Sigma)

62.9 mg/L MnCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Germany)

Los alle chemikalieë op in 1L gedistilleerde water en pas die pH aan met 10 N

NaOH na 7.4

#### 4.1.14 Witsel telvloeistof

Die volgende reagentie is met 100 ml gedeïoniseerde water gemeng:

1 ml van 'n 0.1% Kristal Violet (Merck)-oplossing

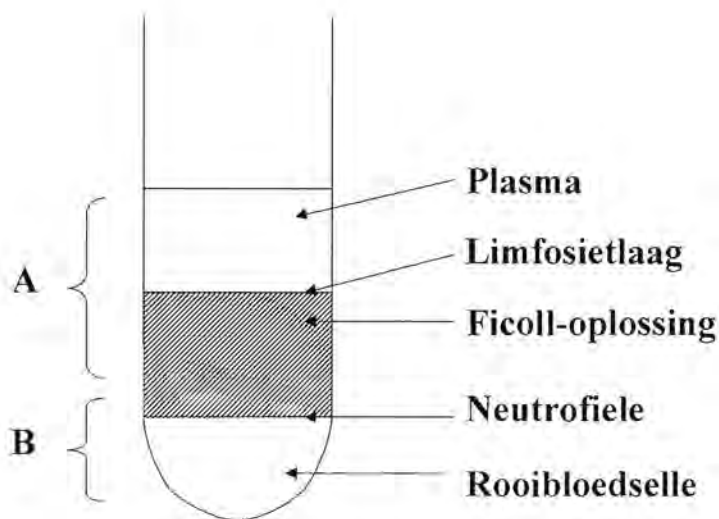
2 ml asynsuur (Saarchem-Holpro Analytics Ltd)

## 4.2 METODEDES

### 4.2.1. Voorbereiding van Menslike Neutrofiele

Veneuse mensbloed van gesonde persone is by heparien (5 eenhede per ml bloed) gevoeg om stolling te voorkom. Neutrofiele is met behulp van die "Ficoll-Hypaque"-tegniek, wat deur Böyum in 1968 beskryf is, geïsoleer. Twee volumes van die bloed is baie versigtig met 'n pipet op een volume van 'n ficoll-oplossing (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA) geplaas en by kamertemperatuur vir 30 minute by 500 g (1600 revolusies per minuut [rpm]) in 'n Beckman TJ-6 sentrifugeerder gesentrifugeer. Na sentrifugasie was die bloedkomponente en ficoll in verskillende lae geskei, soos in Figuur 6 (bl. 61) aangetoon. Die gedeelte wat met A op die diagram aangedui word, is verwyder en die res (B) is behou. Die oorblywende rooibloedselle en neutrofiele (B) is hersuspendeer in 20 ml van 'n 3 % gelatienoplossing (Difco Laboratories, Detroit, USA) (opgelos in FBS). Die suspensie is daarna vir 20 minute by 37<sup>0</sup>C gelaat sodat die rooibloedselle kan sedimenteer. Die neutrofielryke boonste laag is verwyder en die oorblywende selle met 'n 0.83 % ammoniumchloried-oplossing by 4<sup>0</sup>C vir 10 minute behandel om die res van die

rooibloedselle te liseer. Die gesuiwerde neutrofiële is vir 10 minute by 500 g gesentrifugeer en gewas in FBS om moontlike sameklompings van neutrofiële te verhoed. Die suspensie wat sodoende verkry is, het uit meer as 90 % neutrofiële bestaan en is met gepaste medium na die verlangde selkonsentrasie verdun.



**Figuur 6:** Diagrammatiese voorstelling van die buis met Ficoll-oplossing en heparien behandelde bloed na sentrifugasie.

#### 4.2.2. Voorbereiding van Menslike Mononukleêre Leukosiete

Steriele werksprosedures is deurgaans gevolg. Alle pipetpunte is geoutoklaveer en in geslote houers gestoor. Slegs steriele, wegdoenbare plastiese ware (soos eksperimentele buise, mikrotiterplate, ens.) is gebruik. Bottels met media is steriel gehou deur hulle slegs in 'n laminêre vloeikabinet te open en by 4<sup>0</sup>C te stoor. Wanneer onsteriele reagense of eksperimentele middels vir 'n eksperiment benodig is, is hulle deur middel van filtrasie gesteriliseer en slegs in 'n laminêre vloeikabinet gebruik. Eksperimente is deurgaans in 'n laminêre vloeikabinet uitgevoer wat gereeld gesteriliseer is deur dit met 70 % alkohol uit te vee.

Veneuse mensbloed is op 'n ficoll-oplossing gepipetteer soos in 4.2.1 beskryf is. Na die 30 minute sentrifugasie stap is die plasma verwyder en die MNL-band oorgedra na 50 ml polistireen sentrifugeerbuis. Die MNL-suspensie is met RPMI 1640 medium (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland) gewas deur dit twee maal vir 10 min by 200 g (1000 rpm) te sentrifugeer. Laasgenoemde wasstappe is herhaal deur 'n 0.83% NH<sub>4</sub>CL-oplossing by te voeg om alle moontlik kontaminerende eritosiete te liseer, waarna twee verdere wasstappe met RPMI 1640 medium gevolg het. Die suspensie wat sodoende verkry is, is in HI FKS gesupplementeerde RPMI medium na die gewenste konsentrasie hersuspendeer.

#### ***Voorbereiding van 'n monosiet-arme MNL-suspensie***

Die MNL-suspensie wat in eersgenoemde prosedure voorberei is, is met 15 ml HI FKS gesupplementeerde RPMI medium verdun en in 'n 75 cm<sup>2</sup> weefselkultuurfles (Corning Costar Corporation, Cambridge, USA) vir 90 minute by 37<sup>0</sup>C in 'n 5 % CO<sub>2</sub>-atmosfeer geïnkubeer. Tydens hierdie inkubasie tydperk kry die monosiete in die selsuspensie die geleentheid om aan die bodem van die weefselkultuurfles vas te heg ('n eienskap van monosiete). Na inkubasie word die medium met oorwegend limfosiete, na 'n steriele 15 ml polistireen proefbuis oorgedra en vir 10 minute teen 200 g gesentrifugeer waarna die bostand versigtig afgegooi is. Die suspensie wat sodoende verkry is, is in HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium na die gewenste konsentrasie hersuspendeer.

#### **4.2.3 Bepaling van MNL-proliferasie**

Steriele werksprosedures is deurgaans gevolg. MNL is voorberei soos in 4.2.2 beskryf is. Veneuse mensbloed is van normale, gesonde vrywilliges, maar ook van HIV-geïnfekteerde individue voor behandeling, asook na 'n 2-week lange behandeling met plasebo, 4 g of 8 g oksihumaat per dag, verkry. Pasiënte wat aan hierdie proef deelgeneem het, moes serologies as HIV-1 geïnfekteer bewys word. Hulle moes ook 18 jaar of ouer wees met CD4 positiewe limfosiettellings tussen 200 en 500 x 10<sup>6</sup>/liter en HIV-1 RNA tussen 500 en 500 000 kopieë/ml. Pasiënte moes 'n lewensverwachting van meer as drie maande gehad het, 'n Wêreld Gesondheids Organisasie prestasie status telling ("World Health Organization performance status score") van < 3 en 'n Karnofski indeks van > 80. Hierdie

ondersoek in ooreenstemming met die “World Medical Association Declaration of Helsinki” uitgevoer. Alle etiese en wettige standaarde, soos vasgestel deur die Universiteit van Pretoria sowel as die Medisyne Beheerraad van Suid Afrika, is nagekom. Skriftelike toestemming om aan hierdie proef deel te neem, is vooraf van die pasiënte verkry. Oksihumaat is in 500 mg kapsules beskikbaar gestel. Daar was 4 eksperimentele groepe in die oorspronklike studie: 2, 4, 6 en 8 gram oksihumaat per dag. Hierdie kliniese proef het nie deel uitgemaak van die PhD studie nie. Bloedmonsters is spesifiek van pasiënte versamel vir ‘n *ex vivo* studie. Vir hierdie studie is slegs die limfosiete van twee eksperimentele groepe gebruik, naamlik die 4 en 6 g groepe. In elke groep is pasiënte gerandomiseer sodat 7 pasiënte die aktiewe middel geneem het, terwyl 2 pasiënte plasebos ontvang het. Die plasebo groep het dieselfde aantal identiese kapsules geneem, maar in hierdie geval het dit laktose bevat.

Die bepaling vir MNL-proliferasie is in ronde-bodem 96-putjie mikrotiterplate (Sterilin Ltd, Feltham, England), uitgevoer. Die totale volume per mikrotiterputjie was deurgaans 300  $\mu$ l (behalwe as anders vermeld word) en elke behandeling is in duplikaat uitgevoer. Honderd mikroliters MNL-suspensie ( $3 \times 10^6$  selle/ml) is by 140  $\mu$ l RPMI 1640 medium (gesupplementeer met 10 % HI FKS, 100 U penisilien/ml en 100  $\mu$ g streptomisien/ml) in putjies van ‘n mikrotiter plaat geplaas en vir 60 minute by 37<sup>0</sup>C in vogtige lug met ‘n inhoud van 5 % CO<sub>2</sub>, geïnkubeer. Daarna is 30  $\mu$ l van die oksihumaat oplossing (5-100  $\mu$ g/ml) asook 30  $\mu$ l fitohemagglutiniën (PHA) (Murex Biotech Ltd., Dartford, England) met ‘n finale konsentrasie van 5  $\mu$ g/ml (optimale konsentrasie soos vooraf vasgestel), by die putjies gevoeg. Kontrole sisteme sonder eksperimentele middel en/of mitogeen is ingesluit. Die plate is vir ‘n verdere 72 ure onder dieselfde toestande geïnkubeer waarna die aantal lewensvatbare selle bepaal is. ‘n Kolorometriese, sitotoksiese MTT-bepaling is daarvoor gebruik.

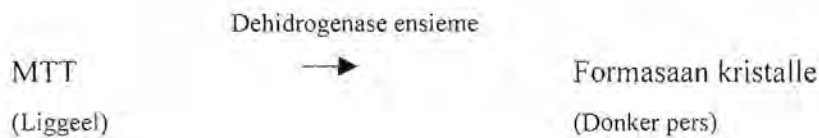
‘n Vergelykende studie is ook tussen oksihumaat en humiensuur (natrium sout; Aldrich-Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI USA) gedoen. Dieselfde metode soos vir die oksihumaat oplossing is hier gevolg.

***Beginsels betrokke by die kolorometriese, sitotoksiese MTT-bepaling***



Tydens die bepaling van die direkte sitotoksiese aktiwiteite van 'n verbinding, is dit nodig om die aantal lewensvatbare, metabolies aktiewe selle, wat na behandeling met die verbinding nog in die toets-sisteem aanwesig is, te kan bepaal. Verskeie tegnieke is beskikbaar om die aantal lewende selle in 'n toets-sisteem te bepaal. Hierdie tegnieke sluit onder andere die inkorporering van radio-aktief gemerkte nukleotiede, soos ( $^3\text{H}$ ) timidien of ( $^{125}\text{I}$ ) jodium-deoksi-uridien, in die DNA van verdelende selle, in. Alhoewel hierdie radio-aktiewe metodes gedeeltelik geoutomatiseer kan word, is die teenwoordigheid van die radio-aktiewe materiaal 'n groot nadeel en is hierdie tegnieke baie arbeid intensief. Mosman het in 1983 'n kolorimetriese MTT-bepaling, wat van mikrotiter plate gebruik maak, ontwikkel. Hierdie tegniek het daartoe bygedra dat 'n groot hoeveelheid monsters terselfdertyd vinnig en akkuraat geanaliseer kan word, sonder om van radio-aktief gemerkte materiaal gebruik te maak (Mosman, 1983).

Die kolorimetriese MTT-bepaling is op die intrasellulêre omskakeling van die geel MTT-substraat na 'n donker pers produk (formasaaan kristalle), gebaseer. Mitochondriale dehidrogenase ensieme in die sel is vir hierdie omskakeling verantwoordelik (Mosman, 1983).



Indien 'n homogene sel-populasie, soos MNL gebruik word, is die hoeveelheid formasaaan kristalle wat in 'n putjie gegenereer word, direk eweredig aan die aantal lewensvatbare, metabolies aktiewe selle wat na behandeling nog in die putjie teenwoordig is. Die kleur intensiteit van die intrasellulêre geproduseerde formasaaan kristalle in 'n putjie, is direk eweredig aan die aantal lewensvatbare selle wat in die putjie aanwesig is. Die omskakeling van MTT na formasaaan kristalle kan nie deur dooie selle, eritrosiete en/of die medium geïnduseer word nie (Mosman, 1983). Hierdie bepaling is dus spesifiek vir lewensvatbare, metabolies aktiewe selle.

### **Metode**

Nadat die eksperimentele mikrotiter plaat vir 3 dae geïnkubeer is, is 30 µl van 'n 5 mg/ml MTT-oplossing by elke putjie gevoeg. Die plaat is vir 'n verdere 4 uur by 37°C in die teenwoordigheid van vog en CO<sub>2</sub> geïnkubeer. Die mikrotiter plate is na inkubasie met MTT vir 10 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Die medium in elke putjie is versigtig verwyder, sonder om die donker pers selkonsentraat onder in die putjie te versteur. Honderd-en-vyftig mikroliter (150 µl) FBS is by elke putjie gevoeg en die mikrotiter plaat is weer vir 10 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Die wasstap met FBS is nog een keer herhaal. Na die wasstappe met FBS, is die formasaaan kristalle opgelos deur 50 µl dimetiel sulfoksied (DMSO) (Sigma) in elke putjie te voeg. Die plate is voortdurend geskud totdat die kristalle volledig in die DMSO opgelos het en die mate van MTT reduksie is spektrofotometries met behulp van 'n Ceres UV 900 HDi multiskanderende plaatleser (Biotec Instruments) by 'n toets golflengte van 540 nm en 'n verwysings-golflengte van 620 nm, bepaal. Die resultate is as persentasie van kontrole (onbehandelde selle) aangedui.

#### **4.2.4 Bepaling van Interleukien 2**

##### **Inleiding**

Hierdie bepaling maak van die kwantitatiewe “toebroodjie” ensiem immuunbepalings-tegniek gebruik (sien Figuur 7, bl. 68). Die putjies van mikrotiterplate word bedek met antiliggam wat spesifiek is vir menslike IL-2. Monsters word tesame met 'n tweede antiliggam teen IL-2, in hierdie geval is dit 'n gebiotineerde antiliggam, in die putjies gevoeg. Indien IL-2 teenwoordig is, sal dit aan beide die gebiotineerde antiliggam sowel as die gebonde antiliggam bind. Nadat ongebonde monster proteïene en gebiotineerde antiliggam afgewas is, word 'n streptavidien-peperwortelperoksidase konjugaat by die putjies gevoeg. Interleukien 2 wat aan beide die gebiotineerde sowel as gebonde antiliggam gebind het, sal gevolglik deur die streptavidien konjugaat gebind word. 'n Verdere wasstap verwyder ongebonde konjugaat waarna 'n spesifieke substraat-oplossing vir streptavidien by die putjies gevoeg word. Die mate van kleur wat ontwikkel, is by 'n

golflengte van 450 nm gemeet en is direk eweredig aan die hoeveelheid IL-2 wat in die aanvanklike stap gebind is.

‘n Reeks putjies word ook voorberei waar bekende konsentrasies van die menslike IL-2 standaard gebruik word. ‘n Kurwe word getrek en deur die optiese digthede van die onbekende monsters daarmee te vergelyk, kan die konsentrasies van laasgenoemde bepaal word. Hiervoor is ‘n sagteware program “Graph Pad” (San Diego, USA) gebruik.

### ***Metode***

Die metode vir MNL-proliferasie soos in 4.2.3 bespreek is, is gevolg. Die effek van oksihumaat is slegs op gestimuleerde kulture getoets. Die mikrotiterplate is egter net vir 2 dae geïnkubeer. Volgens preliminêre studies het limfosiete IL-2 optimaal na 2 dae inkubasie by 37<sup>0</sup>C, geproduseer. Hierdie inkubasietydperk is daarna deurgaans vir hierdie eksperimente gebruik. Die plate is daarna vir 10 minute by 200 g gesentrifugeer. Die bostand is in ‘n ensiem immuunbepalingstegniek gebruik met behulp van ‘n toetspakket wat voorskrifte insluit (“[h] IL-2 ELISA system”; Amersham International Plc, Buckinghamshire, England ) en sodoende is die onbekende konsentrasies van IL-2 bepaal. Die resultate is as pg IL-2/ml uitgedruk.

### **4.2.5 Uitdrukking van CD25, CD38 en HLA-DR.**

‘n MNL-suspensie is vanaf gesonde skenkers voorberei soos beskryf in 4.2.2 en met HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium na  $2 \times 10^6$  selle/ml hersuspendeer. Vyfhonderd mikroliter van die genoemde selsuspensie is met 100 µg/ml van die eksperimentele middel in steriele 5 ml polistireen proefbuis geplaas. PHA by ‘n finale konsentrasie van 5 µg/ml is by sommige sisteme gevoeg en die totale volumes van al die buise is met HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium na 1 ml aangepas. Kontrole sisteme sonder eksperimentele middel en/of mitogeen is ingesluit. Die propies van die buise is baie liggies terug geplaas om gasuitruiling tydens inkubasie toe te laat maar steeds onder steriele toestande te bly. Die buise is daarna vir 72 ure, in die geval van CD25 en CD38, en 48 ure, in die geval van HLA-DR, by 37<sup>0</sup>C in ‘n 5% CO<sup>2</sup>-atmosfeer geïnkubeer.

Voorlopige studies het bepaal dat hierdie inkubasie periodes optimaal is vir die uitdrukking van hierdie molekules in die teenwoordigheid van PHA.

Vloesitometriese analise is uitgevoer volgens die metode, met modifikasies, soos deur Rabinovitch & June (1990) beskryf is. 'n Coulter Epics XL-MLC vloesitometer (Coulter Corp, Miami, Florida, USA) wat met 'n 488 nm lug-verkoelde argon laser toegerus is, is vir die analise gebruik en die resultate is as die graad van fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal getal; "median channel number") uitgedruk.

Daar is dwarsdeur slegs van enkel-kleur monoklonale antiligggame gebruik gemaak. Die afbakening van 'n selpopulasie in hierdie geval was uitsluitlik op die limfosiet populasie gemik. Al die monoklonale antiligggame preparate wat in hierdie studie gebruik is, is afkomstig vanaf Dako A/S, Glostrup, Denmark. Die uitdrukking van CD25, CD38 en HLA-DR is met behulp van 'n fluorochroom fluorosien isotiosinaat (FITC)-gekonjugeerde monoklonaal teen die betrokke merkers bepaal. Isotipiese kontroles (IgG1-FITC) om vir outofluoressensie en nie-spesifieke binding te kontroleer, is ook ingesluit.

#### **4.2.6 Bepaling van Interleukien 4**

##### ***Inleiding***

Dieselfde beginsel soos vir IL-2 (sien 4.2.4) is hier van toepassing.

##### ***Metode***

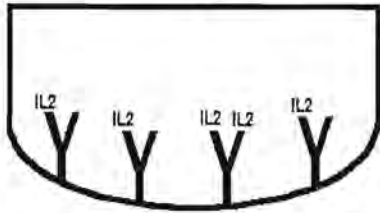
Die hoeveelheid IL-4 wat deur oksihumaat-behandelde menslike limfosiete geproduseer is, is volgens die metode wat in 4.2.4 beskryf is, bepaal. Die konsentrasie van die selsuspensie is in hierdie geval egter na  $4 \times 10^6$  selle/ml verhoog en die mikrotiterplate is slegs vir 24 ure (optimale produksie van IL-4 volgens voorlopige ondersoeke) onder genoemde toestande geïnkubeer. Die toetspakket in hierdie geval was 'n menslike IL-4 ("[h] IL-4 ELISA system"; Amersham) ELISA sisteem. Die resultate is as pg IL-4/ml uitgedruk.

68

Putjie bedek met  $Al^e$  teen IL-2

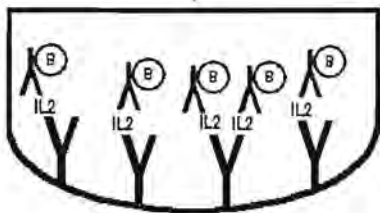


+ monster bevattende IL-2



IL-2 in monster word gebind deur die oppervlakte gebonde  $Al^e$

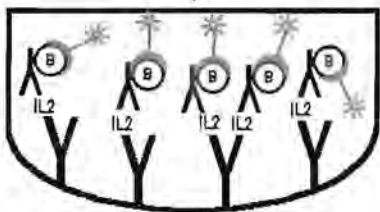
+ gebiotineerde  $Al^e$  teen IL-2



Gebiotineerde- $Al^e$  bind aan gebonde IL2

Was om ontslae te raak van ongebonde gebiotineerde  $Al^e$

+ streptavidien/peperwortelperoksidase konjugaat



Streptavidien/peperwortelperoksidase konjugaat bind aan biotien

Was om ontslae te raak van ongebonde streptavidien konjugaat

+ TMB substraat (3,3',5,5'-tetrametilbenzidien/  
waterstof peroksied oplossing)

substraat reageer met peperwortelperoksidase

kleur reaksie - lees optiese digtheid by 450 nm

**Figuur 7:** Grafiese voorstelling van die proses betrokke by die IL-2 ensiembepaling.

#### 4.2.7. Bepaling van Interleukien 6

##### *Inleiding*

Dieselfde beginsel soos vir IL-2 (sien 4.2.4) is hier van toepassing.

##### *Metode*

Dieselfde prosedure soos vir IL-2 (sien 4.2.4) is gevolg behalwe vir die supernatante wat in hierdie geval as volg verdun is: Die supernatante van die rustende sisteme is 1/50 verdun terwyl die supernatante van die gestimuleerde sisteme 1/100 met RPMI medium verdun is voordat die bepaling van IL-6 volgens die voorskrifte in die toetspakket (“[h] IL-6 ELISA system”; Amersham International Plc) daarop uitgevoer is. Hierdie verdunnings was nodig aangesien van ‘n baie sensitiewe sisteem gebruik gemaak is. Preliminêre studies het getoon dat konsentrasies van IL-6 in die supernatante te hoog was en geskikte verdunnings is daarvolgens bepaal. Die resultate is as pg IL-6/ml uitgedruk.

#### 4.2.8. Bepaling van Interleukien 10

##### *Inleiding*

In die geval van IL-10 bepaling is gebruik gemaak van ‘n “High sensitivity interleukin 10 ELISA system” wat aanbeveel word vir die analise van kultuur supernatante en serum monsters. Dieselfde beginsel soos vir IL-2 (sien 4.2.4), behalwe vir een bykomstige stap, is hier van toepassing. Nadat al die ongebonde gebiotineerde antiliggame afgewas is, word ‘n versterkingsreagens bygevoeg. Die versterkingsreagens verhoog die sensitiwiteit van die reaksie deurdat heelwat peperwortel peroksidase molekules asook streptavidien molekules daaraan bind. Die ongebonde versterkingsreagens word afgewas waarna die substraat bygevoeg word.

##### *Metode*

Vyfhonderd mikroliter van ‘n  $2 \times 10^6$ /ml MNL-suspensie, word met 300  $\mu$ l HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium vir 15 min by 37°C in ‘n 5 % CO<sub>2</sub>-atmosfeer, gepreïnkubeer. Daarna is 100  $\mu$ l van die geneesmiddel by ooreenstemmende buisies

gevoeg en vir 'n verdere 15 min onder soortgelyke toestande geïnkubeer. Na laasgenoemde inkubasie periode is 100 µl PHA met 'n finale konsentrasie van 5 µg/ml (optimale konsentrasie soos vooraf vasgestel) by die gestimuleerde sisteme en 100 µl HI FKS gesupplementeerde RPMI by die rustende sisteme, gevoeg. Die buise is vir 'n verdere 2 dae by 37°C in 'n 5% CO<sub>2</sub>-atmosfeer geïnkubeer waarna hulle vir 10 min by 500 g gesentrifugeer is. Die bostande moes 1/100 met RPMI medium verdun word vir die finale analise. Hierdie verdunning was noodsaaklik aangesien preliminêre proewe wat uitgevoer is, getoon het dat hierdie spesifieke toetsstelsel te sensitief was vir die hoeveelheid IL-10 teenwoordig in die monsters. Die verdunde supernatante is verder met behulp van die toetspakket wat voorskrifte ingesluit het ("[h] IL-10 ELISA system"; Amersham International Plc), geprosesseer om die onbekende IL-10 waardes te bepaal. Die resultate is as pg IL-10/ml uitgedruk.

#### **4.2.9 Bepaling van Tumor Nekrose Faktor $\alpha$**

##### ***Inleiding***

Dieselfde beginsel soos vir IL-2 (sien 4.2.4) is hier van toepassing.

##### ***Metode***

Limfositete is met 'n reeks verdunnings van oksihumaat (20-100 µg/ml) behandel om die effek daarvan op TNF- $\alpha$ -produksie te ondersoek. Dieselfde metode soos vir IL-6 beskryf (sien 4.2.7), is vir die bepaling van TNF- $\alpha$  gevolg. Die supernatante van die rustende sisteme is (volgens voorlopige studies vasgestel) <sup>1</sup>/<sub>50</sub> verdun terwyl die supernatante van die gestimuleerde sisteme <sup>1</sup>/<sub>100</sub> met RPMI medium verdun is, alvorens die bepaling met behulp van 'n toetspakket, wat voorskrifte insluit ("[h] TNF- $\alpha$  ELISA system"; Amersham International Plc), uitgevoer is. Die resultate is as pg TNF- $\alpha$ /ml uitgedruk.

#### **4.2.10 Bepaling van Interferon $\gamma$**

##### ***Inleiding***

Dieselfde beginsel soos vir IL-2 (sien 4.2.4) is hier van toepassing.

##### ***Metode***

Dieselfde prosedure soos vir IL-2 beskryf is (sien 4.2.4), met enkele uitsonderings, is vir die bepaling van IFN- $\gamma$  gevolg. Die oksihumaat-behandelde MNL is vir 3 dae na stimulasie by 37<sup>0</sup>C in die teenwoordigheid van 5% CO<sub>2</sub> geïnkubeer. Volgens preliminêre studies is vasgestel dat limfosiete na 3 dae inkubasie by 37<sup>0</sup>C, IFN- $\gamma$  maksimaal produseer. Die plate is daarna ook vir 10 minute by 200 g afgeswaai, maar die supernatante van die gestimuleerde sisteme is 1/100 (volgens voorlopige studies vasgestel) met RPMI medium verdun terwyl die rustende sisteme onverdund gebruik is. Die verdunning was nodig aangesien die sisteem wat gebruik is te sensitief was vir die groot mate van IFN- $\gamma$  wat deur die gestimuleerde limfosiete geproduseer is. Die supernatante is met behulp van 'n toetspakket en volgens die voorskrifte van die vervaardiger (“[h] IFN- $\gamma$  ELISA system”; Amersham International Plc) vir die teenwoordigheid van IFN- $\gamma$  ondersoek. Die resultate is as pg IFN- $\gamma$ /ml uitgedruk.

#### **4.2.11 Bepaling van Prostaglandien E<sub>2</sub>**

##### ***Inleiding***

Die PGE<sub>2</sub> kompeterende ensiem immuunbepalingssisteem deur Amersham International Plc is spesiaal vir navorsingsdoeleindes ontwerp en berus op die kompetisie tussen ongemerkte PGE<sub>2</sub> en 'n gefikseerde hoeveelheid van peroksidase-gemerkte PGE<sub>2</sub> vir 'n beperkte aantal bindingsareas op 'n PGE<sub>2</sub> spesifieke antiliggaam. Die toetspakket sluit protokolle in waar lisereagense gebruik word wat doeltreffende ekstraksie van PGE<sub>2</sub> vanuit selkulture bewerkstellig. In die eerste stap word 'n lisereagens by die selkultuur gevoeg wat die selmembraan hidroliseer om intrasellulêre PGE<sub>2</sub> vry te stel. Die tweede lisereagens sekwesteer die sleutelkomponent van die eerste lisereagens en verseker dat PGE<sub>2</sub> vry is vir



daaropvolgende analise sonder om met antigeen: antiliggaam binding in te meng. Die antisera en PGE<sub>2</sub> peroksidase konjugaat is by die tweede lisereagens ingesluit.

Bok anti-muis antiliggame is in die putjies van mikrotiterplate gefikseer. 'n Tweede antiliggaam, naamlik 'n muis anti-PGE<sub>2</sub> antiliggaam, sowel as óf verskillende bekende konsentrasies PGE<sub>2</sub> óf die monsters met onbekende hoeveelhede PGE<sub>2</sub>, word by die putjies gevoeg. Die tweede antiliggaam bind aan die gefikseerde bok anti-muis antiliggaam terwyl PGE<sub>2</sub> in die monster weer aan die muis anti-PGE<sub>2</sub> bind. Daarna word 'n PGE<sub>2</sub> peroksidase konjugaat by die putjies gevoeg wat aan die oorblywende muis –anti-PGE<sub>2</sub> antiliggame sal bind. Enige ongebonde ligand kan maklik deur 'n wasprosedure verwyder word. Die hoeveelheid peroksidase gemerkte PGE<sub>2</sub> wat aan die antiliggaam gebind word, word deur die byvoeging van 'n TMB substraat (3,3',5,5'-tetrametielbenzidien/waterstof peroksied oplossing) bepaal waarna 'n suuroplossing die reaksie stop (sien Figuur 8, bl. 73). Die optiese digthede (OD) is spektrofotometries bepaal by 'n golflengte van 450 nm.

Resultate is as volg bereken: % Gebonde/ongebonde PGE<sub>2</sub> =

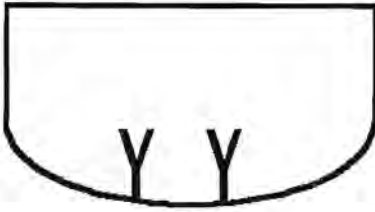
$$\frac{\text{OD van standaard of monster} - \text{OD van Nie-spesifieke-binding(NSB)}}{\text{OD van agtergrond PGE}_2 - \text{OD van NSB}} \times 100$$

'n Standaardkromme kan hiervolgens gegenerer word deur die persentasie gebonde/ongebonde PGE<sub>2</sub> as 'n funksie van die log PGE<sub>2</sub> konsentrasie te plot. Die pg/putjie waarde kan direk van die standaardkromme gelees word.

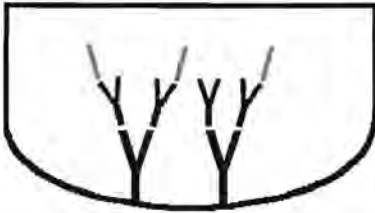
### **Metode**

Mononukleêre leukosiete is in HBSO na  $4 \times 10^6$  selle/ml hersuspendeer waarvan 500 µl hiervan asook 300 µl HBSO in 5 ml proefbuisie geplaas is en by 37°C in 'n 5% CO<sub>2</sub>-atmosfeer gepreïnkubeer is. Daarna is 100 µl van die eksperimentele middel by ooreenstemmende buisies gevoeg en vir 'n verdere 15 minute onder soortgelyke toestande geïnkubeer. Die behandelde MNL is met 'n finale konsentrasie van 100 ng/ml forbol-12-miristaat-13-asetaat (FMA) gestimuleer terwyl rustende kontroles die ooreenstemmende

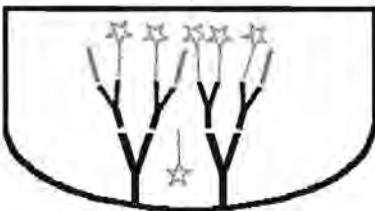
Putjie bedek met bok anti-muis  $Al^e$



+ monster met  $PGE_2$  ( / )  
+ muis anti- $PGE_2$  ( Y )



+  $PGE_2$ /peroksidase konjugaat ( ☆ )



Was om ontslae te raak van ongebonde konjugaat



+ TMB substraat (3,3',5,5'-tetrametielbezidien/  
waterstof peroksied oplossing)

substraat reageer met peperwortelperoksidase

Kleur reaksie vind plaas – stop met swaelsuur oplossing

lees optiese digtheid by 450 nm

**Figuur 8** : Grafiese voorstelling van die proses betrokke by die  $PGE_2$  ensiembepaling waar  $PGE_2$  wel teenwoordig is.

hoeveelheid HBSO ontvang het en vir 'n verdere 20 min geïnkubeer is. Al die proefbuis is daarna vir 10 minute by 500 g gesentrifugeer en 50  $\mu$ l van die supernatante is met behulp van 'n toetspakket wat voorskrifte insluit ("Prostaglandin E<sub>2</sub> ensymeimmunoassay"; Amersham International Plc) geprosesseer om die PGE<sub>2</sub> konsentrasies van elkeen te bepaal. Alhoewel hierdie metode optimaal was vir die bepaling van PGE<sub>2</sub> konsentrasies, is dieselfde supernatante vir die bepaling van LTB<sub>4</sub> konsentrasies gebruik (sien in 4.2.12). Die resultate word as pg PGE<sub>2</sub>/putjie uitgedruk.

#### **4.2.12 Bepaling van Leukotriene B<sub>4</sub>**

##### ***Inleiding***

Dieselfde beginsel soos vir PGE<sub>2</sub> (sien 4.2.11) is hier van toepassing. In hierdie geval word egter van donkie anti-haas en haas anti-LTB<sub>4</sub> antiligggame gebruik gemaak. 'n Standaardkromme, wat ook die lineariteit van verdunnings van die standaard aantoon, word volgens die formule soos beskryf in 4.2.11 gegengereer en die pg/putjie waarde van die monsters kan direk van die standaardkromme geles word.

##### ***Metode***

Dieselfde prosedure as in die geval met PGE<sub>2</sub> (sien 4.2.11) word gevolg om MNL te behandel en die supernatant vir die LTB<sub>4</sub> bepaling voor te berei wat ook met behulp van 'n toetspakket insluitende voorskrifte ("Leukotriene B<sub>4</sub> ensymeimmunoassay system"; Amersham International Plc), uitgevoer word. Die resultate word as pg LTB<sub>4</sub>/putjie uitgedruk.

#### **4.2.13 Bepaling vir CR3 Uitdrukking**

Vars getapte veneuse mensbloed van gesonde persone is by K<sub>3</sub>EDTA (10  $\mu$ l per ml bloed) gevoeg om stolling te voorkom. Agt honderd mikroliter (800  $\mu$ l) hoeveelhede van die bloed is in 5 ml polistireen proefbuis geplaas waarna die buise met NH<sub>4</sub>CL oplossing (4.1.1) opgevolg en vir 10 minute op ys geplaas is. Die buise is vir 10 minute by 500 g (1600 rpm) gesentrifugeer en een maal met NH<sub>4</sub>CL-oplossing gewas om te verseker dat

enige kontaminerende rooibloedselle deur lise verwyder is. Daarna is die selle twee maal met HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium vir 10 minute by 500 g gewas.

Sewehonderd mikroliter (700  $\mu$ l) HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium word by die gewaste selsuspensies gevoeg en vir 15 minute in 'n waterbad by 37<sup>0</sup>C geïnkubeer. Daarna word 100  $\mu$ l van die eksperimentele middel by die relevante buise gevoeg en weereens vir 15 minute in 'n waterbad by 37<sup>0</sup>C geïnkubeer. In hierdie proef word van twee stimulant gebruik gemaak waarvan elk se optimale konsentrasie deur preliminêre eksperimente vasgestel is, naamlik FMA by 'n finale konsentrasie van 100 ng/ml en N-formiel-metioniel-leusiel-feniellalanien:sitokalasien B mengsel (FMLF:SB) by 'n finale konsentrasie van 2  $\mu$ M:1  $\mu$ M. FMLF is 'n sterk sintetiese stimulant terwyl SB 'n fungale metaboliet is wat neutrofiel die vermoë om te fagositêer ontnem en daardeur word verseker dat die granule inhoud uitgeskei word. Die gestimuleerde sisteem het 100  $\mu$ l van genoemde stimulant ontvang terwyl rustende sisteme 100  $\mu$ l HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium ontvang het. Die FMA-gestimuleerde sisteem is vir 5 minute en die FMLF:SB-gestimuleerde sisteem vir 30 minute in 'n waterbad by 37<sup>0</sup>C geïnkubeer.

Vir die vloeisitometriese analise is 5  $\mu$ l van die monoklonale antiliggam [fluorochroom fluorosien isotiosianaat (FITC)-gekoppelde antiliggam teen CD11b] in nuut gemerkte buisies geplaas waarby 100  $\mu$ l behandelde selsuspensies gevoeg is vir die bepaling van CR3. IgG<sub>1</sub>FITC (isotipiese kontrole) is vir die bepaling van nie-spesifieke binding ingesluit. Daar is dwarsdeur slegs van enkel-kleur monoklonale antiliggam gebruik gemaak. Die neutrofiel venster is opgestel gebaseer op ligverspreiding en die afbakening van die selpopulasie is volgens standaard prosedures uitgevoer. Analise is uitgevoer met behulp van 'n Coulter Epics XL-MLC vloeisitometer (Coulter Corp., Miami, Florida) voorsien van 'n lugverkoelde argon laser by 485 nm. Die resultate is as die graad van fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal getal; "mean channel number") uitgedruk. Aangesien slegs van 'n enkele kleur fluoressensie gebruik gemaak is, was kompensasië vir kleur nie nodig nie.

#### 4.2.14 Bepaling van Neutrofiel Vashegting aan E-selektien en ICAM-1 deur gebruik te maak van Getransfekteerde Fibroblast Sellyne

'n Metode wat die spesifieke bepaling van neutrofielvashegting aan die endoteliale sel vashegtingsreseptore E-selektien en ICAM-1 moontlik maak, is ontwikkel (Håkanson *et al.*, 1994). Vashegting van granulose aan vaskulêre endoteliale selle word deur induksie en aktivering van vashegtingsmolekules op granulose en endoteliale selle bemiddel. Neutrofiel granulose besit die vermoë om aan die endoteliale vashegtingsmolekules E-selektien en ICAM-1 vas te heg (Albelda en Buck, 1990; Bevilacqua, 1993). ICAM-1 op endoteelselle is die ligand van die CD11a/CD18 en die CD11b/CD18 komplekse. Laasgenoemde kompleks is ook die C3bi-reseptor. Vashegting aan E-selektien word bemiddel deur sialiel-Lewis<sup>x</sup>. Die hoeveelheid granulose wat na behandeling vasgeheg het, is met behulp van 'n ensiematiese peroksidase metode, waar 1,2-fenileendiamien (OPD) as substraat aangewend word (Håkanson *et al.*, 1994), bepaal.

Om hierdie getransformeerde sellyne voor te berei, is van 'n baba hamster niersellyn (BHK-21) (ATCC CCL 10) gebruik gemaak (Chen en Okayama, 1987). Die getransformeerde selle is in 'n groeimedium, waarby metotreksaat gevoeg is, geselekteer.

##### ***Kweking en instandhouding van normale en getransformeerde BHK sellyne***

Baba hamster nierfibroblaste, normaal (BHK) en getransformeerde sellyne, is onderhou in Dulbecco se gemodifiseerde Eagle se medium (DMEM) (Biowhittaker, Walkersville, Maryland) wat met 10 % HI FKS, 100 U penisillien/ml en 100 µg streptomisien/ml gesupplementeer is. Metotreksaat (Sigma) is by die medium van getransformeerde sellyne, by 'n finale konsentrasie van 1 µmol/L, gevoeg. Die getransformeerde sellyne het bestaan uit (i) BHK 126-16 wat menslike E-selektien op sy oppervlakte uitdruk en (ii) BHK 331-7 wat menslike ICAM-1 op sy oppervlakte uitdruk. Die oorspronklike sellyn, naamlik BHK-21, is as kontrole in die eksperimente gebruik.

Die fibroblaste is by 37<sup>0</sup>C in 'n 5 % CO<sub>2</sub>-atmosfeer gekweek en elke derde of vierde dag gepasseer. Hierdie sellyne heg vas aan die bodem van die weefselkultuur fles en vorm 'n

“mat” wat met behulp van ‘n tripsien verseen oplossing (Biowhittaker, Walkersville, Maryland) verwyder word wanneer hulle gepasseer of vir eksperimente benodig word.

Die uitdrukking van ICAM-1 vashegtingsmolekules is vloesitometrië bevestig met behulp van ‘n fluoro-chroom fluorosien isotiosianaat (FITC)-gekonjugeerde monoklonale antiliggaam teen CD54. In die geval van E-selektien, is van CD62E ELAM-1 gebruik gemaak. Hierdie produk bestaan uit twee verskillende antiliggame, naamlik ‘n ongemerkte bok antiliggaam wat aan E-selektien op die fibroblast selle bind en ‘n tweede FITC-gekonjugeerde muis monoklonale antiliggaam (IgG [Fc]) wat gerig is teen bok F(ab')<sub>2</sub> fragment en dus aan eersgenoemde bind. Die vloesitometriese prosedures wat gevolg is, is reeds volledig in 4.2.5 beskryf.

Die BHK-21 sellyn het 2.95 % ICAM-1 en 3.3 % E-selektien uitgedruk, die BHK 126-16 sellyn het 2.35 % ICAM-1 en 94.0 % E-selektien uitgedruk terwyl die BHK 331-7 sellyn 99.2 % ICAM-1 en 2.3 % E-selektien uitgedruk het.

#### ***Voorbereiding van fibroblast sellyne vir gebruik in eksperimente***

Die medium van ‘n 75% volgegroeide fles is verwyder en vervang met 2 ml van ‘n 0.2 % steriele tripsien verseen oplossing. Die fles is versigtig geskud, die vloeistof is weereens verwyder en vervang met 4 ml tripsien verseen oplossing waarna dit vir 3-5 minute by 37<sup>0</sup>C geherinkubeer is. Die los selle is na ‘n 15 ml polistireen proefbuis oorgedra, opgevol met HI FKS gesupplenteerde DMEM en vir 10 minute teen 200 g (1000 rpm) gesentrifugeer. Die boonste medium is versigtig afgegooi en die selsuspensie is met HI FKS gesupplenteerde DMEM na  $1 \times 10^5$  selle/ml hersuspendeer.

#### ***Bepaling van neutrofielvashegting***

Steriele werksprosedures is deurgaans gevolg (sien 4.2.2). Hierdie tegniek is op rondobodem 96-putjie mikrotiterplate (Sterilin Ltd, Feltham, England) uitgevoer. Die totale volume per mikrotiterputjie was 200  $\mu$ l en elke behandeling is in triplikaat uitgevoer. Elke putjie het 100  $\mu$ l HI FKS gesupplenteerde DMEM medium asook 100  $\mu$ l van ‘n  $1 \times 10^5$  fibroblaste/ml suspensie ontvang. Die plaat is vir 24 ure by 37<sup>0</sup>C in ‘n 5 % CO<sub>2</sub>-atmosfeer

geïnkubeer. Die plaat is drie maal met die toetsbuffer gewas (met behulp van 'n multipipet) en deeglik droog geklad. Daarna is 140 µl toetsbuffer by al die putjies gevoeg asook 20 µl van die eksperimentele middel in bestemde putjies. Die plaat is vir 15 minute onder dieselfde toestande as voorheen geïnkubeer. Twintig mikroliter selsuspensie met 'n konsentrasie van  $2.5 \times 10^6$  selle/ml is by elke putjie gevoeg, gevolg deur 20 µl FMA met 'n finale konsentrasie van 25 ng/ml wat by gestimuleerde sisteme gevoeg is, terwyl rustende sisteme 20 µl toetsbuffer ontvang het. Die verhouding van neutrofiële tot fibroblaste, naamlik 5:1, is vooraf vir optimale vashegting bepaal. Die plaat word vir 60 minute by 37°C in 'n 5 % CO<sub>2</sub>-atmosfeer geïnkubeer waarna dit drie maal met toetsbuffer gewas en deeglik droog geklad is. Vervolgens is 100 µl OPD-substraatoplossing by al die putjies gevoeg, die plaat is vir 3-5 minute by kamertemperatuur gelaat en daarna is 100 µl stopoplossing (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) by die putjies gevoeg. 'n Kleurreaksie ontstaan en die mate van MPO-produksie is spektrofotometries by 'n golflengte van 492 nm bepaal.

'n Reeks verdunnings (1-100%) van die neutrofiëlsuspensie wat vir bogenoemde bepaling gebruik is, is op dieselfde manier geprosesseer om die MPO-produksie met aantal neutrofiële te kontroleer.

#### **4.2.15 Bepaling van Eosinofiliese Kationiese Proteïene (EKP) met behulp van Radio Isotoop Opname (RIO)**

##### ***Inleiding***

Eosinofielgranules bevat onder andere unieke eosinofiliese kationiese proteïene en die mate van vrystelling daarvan is 'n indikatie van eosinofiel degranulasie. 'n Preliminêre studie het getoon dat die Unicap EKP Fluoro-ensiem-immunobepaling (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Swede), as gevolg van oksihumaat se intensiewe kleur, nie geskik was nie. Vir hierdie bepaling is daar dus van 'n radio-aktiewe toetspakket (Pharmacia AB, Uppsala, Swede) gebruik gemaak wat twee verskillende antiligggame bevat het. EKP in die monsters het met 'n gefikseerde hoeveelheid <sup>125</sup>I-gemerkte EKP vir die bindingsareas van spesifieke antiligggame gekompeteer. Gebonde en vry EKP is geskei deur byvoeging van 'n tweede antiligggame "immunesorbent" waarna die buisies afgeswaai

en die bostand versigtig afgegooi is. Die mate van radio-aktiwiteit is met behulp van 'n vaste fase gammateller (LKB Wallac) bepaal en is omgekeerd proporsioneel aan die hoeveelheid EKP in die monster.

### **Metode**

Oorspronklik is eosinofiliese granulosiete vanuit perifere bloed volgens die metode van Egesten *et al.* (1998) geïsoleer, maar aangesien eosinofiele so 'n lae persentasie van die leukosiete, wat hoofsaaklik uit neutrofiële bestaan, uitmaak, was dit moeilik om voldoende selle vir die eksperiment te bekom. Granulosiete as 'n geheel is vervolgens geïsoleer volgens die standaard metode wat reeds beskryf is (sien 4.2.1) en bloed is vanaf persone met 'n eosinofielpersentasie van tussen 5-10% verkry. Die geïsoleerde granulosiete is met HBSO na 'n konsentrasie van  $1 \times 10^7$  selle/ml hersuspendeer en 600  $\mu$ l daarvan is met 100  $\mu$ l van die eksperimentele middel (5  $\mu$ g – 100  $\mu$ g/ml) in verskillende polistireen buise gevoeg. Die volume van elke buis is met HBSO na 0.9 ml opgemaak. Die buise is vir 10 min by 37<sup>0</sup>C geïnkubeer. Honderd mikroliter (100  $\mu$ l) van die stimulant [FMLF (2  $\mu$ M) in kombinasie met SB (2  $\mu$ g/ml), of geïpsoneerde Sephadex krale] is by die buise gevoeg en vir 'n verdere 15 minute by 37<sup>0</sup>C geïnkubeer. Kontroles (sonder eksperimentele middel) van rustende selle en gestimuleerde selle is by al die eksperimente ingesluit. Na die inkubasie periode is die buise vir 10 minute in 'n ysbad geplaas waarna hulle vir 5 minute by 700 g gesentrifugeer is. Die neutrofielvrye supernatante is daarna na skoon buise oorgedra. Die mate van EKP in die supernatante is volgens die voorskrifte van die vervaardiger bepaal. Die orige supernatante is by –70<sup>0</sup>C vir miëloperoksidase (MPO) analise gevries.

#### **4.2.16 Bepaling van Miëloperoksidase**

Neutrofiel degranulasie word bepaal volgens die mate van vrystelling van MPO vanaf die primêre granules.



### **Metode**

Die MPO substraat guaiacol en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (finale konsentrasie by 10 mM en 5 mM respektiewelik) is by 'n finale reaksie volume van 250 µl supernatant (verkry soos beskryf in 4.2.15) gevoeg en ensiemaktiwiteit is spektrofotometries by 'n golflengte van 450 nm gemonitor (Anderson *et al.*, 1981). Peperwortelperoksidase (Sigma) is as standaard gebruik om 'n kalibrasiekurve op te stel.

Die kleurintensiteit van oksihumaat het nie die MPO spektrofotometriese lesings beïnvloed nie. Daar is hiervoor gekontroleer deur die eksperimentele middel eers na degranulasie van die selle by die sisteem te voeg.

#### **4.2.17 Bepaling van die Sitotoksiese Aktiwiteit van Oksihumaat-behandelde MNL**

In hierdie studie word van 'n menslike lewerkanker sellyn sowel as van gesuiwerde MNL gebruik gemaak.

#### ***Kweking en Instandhouding van Lewerkanker Selle***

'n Menslike lewerkanker sellyn (PLC) (ATCC CRL 8024) is in Earl se minimum essensiële medium (E MEM) (Biowhittaker, Walkersville, Maryland) onderhou. Die medium is met 5 % HI FKS, 100 U penissilien/ml en 100 µg streptomisien/ml gesupplementeer. Die PLC selle is in laasgenoemde medium by 37<sup>0</sup>C in 'n 5 % CO<sub>2</sub>-atmosfeer gekweek en elke derde of vierde dag gepasseer. Die selle heg vas aan die bodem van die weefselkultuur fles en vorm 'n mat wat met behulp van 'n tripsien verseen oplossing verwyder is wanneer hulle gepasseer of vir eksperimente nodig is.

#### ***Voorbereiding van PLC selle vir gebruik in eksperimente***

Die medium van 'n 75 % volgegroeide fles is verwyder en vervang met 2 ml van 'n 0.2 % steriele tripsien verseen oplossing (Biowhittaker, Walkersville, Maryland). Die fles is versigtig geskud, die vloeistof is weereens verwyder en vervang met 4 ml tripsien verseen oplossing waarna dit vir 3-5 minute by 37<sup>0</sup>C geherinkubeer is. Die los selle is na 'n 15 ml polistireen proefbuis oorgedra, opgevol met HI FKS gesupplementeerde E MEM en vir 10

minute teen 200 g (1000 rpm) gesentrifugeer. Die boonste medium is versigtig afgegooi en die selsuspensie is met HI FKS gesupplementeerde E MEM na  $2 \times 10^5$  selle/ml hersuspendeer.

### ***MNL-suspensie***

'n MNL-suspensie is voorberei soos in 4.2.2 beskryf en is na  $1 \times 10^6$  selle/ml hersuspendeer.

### ***Metode***

Die totale volume per mikrotiterputjie was deurgaans 300  $\mu$ l en elke behandeling is in duplikaat uitgevoer. Honderd mikroliter PLC selle ( $2 \times 10^5$  selle/ml) is met 40  $\mu$ l HI FKS gesupplementeerde E MEM medium in putjies van 'n mikrotiterplaat geplaas en vir 30 minute by 37°C in vogtige lug met 5 % CO<sub>2</sub> geïnkubeer. Daarna is 100  $\mu$ l MNL-suspensie ( $1 \times 10^6$  selle/ml) by die putjies gevoeg en vir 'n verdere 30 minute onder dieselfde toestande geïnkubeer. Die verhouding tussen teikenselle:MNL was 1:5. Dertig mikroliter (30  $\mu$ l) van die eksperimentele middel (5-100  $\mu$ g/ml) is in relevante putjies geplaas, die plaat is weereens vir 30 minute onder soortgelyke toestande geïnkubeer waarna 30  $\mu$ l fitohemagglutinien (PHA) (Murex Biotech Ltd., Dartford, England) met 'n finale konsentrasie van 5  $\mu$ g/ml (optimale konsentrasie soos vooraf vasgestel), by die putjies gevoeg is. Kontrole sisteme sonder eksperimentele middel en/of mitogeen is ingesluit asook PLC-selle, wat in die afwesigheid van MNL, op dieselfde wyse gekweek en behandel is. Die plate is vir 'n verdere 72 ure onder dieselfde toestande geïnkubeer. Die MNL is na die inkubasie tydperk verwyder deur die mikrotiterplate liggies te skud, die vloeistof uit te skud en 150  $\mu$ l HI FKS gesupplementeerde E MEM by alle putjies te voeg. Hierdie wasproses is drie maal herhaal en sodoende het slegs die vasgehegte PLC-selle in die putjies oorgebly. Daarna is 200  $\mu$ l HI FKS gesupplementeerde E MEM medium by al die putjies gevoeg en die mitokondriale aktiwiteit van die PLC-selle is met behulp van die MTT kleurmetode bepaal (sien 4.2.3).

#### 4.2.18 Bepaling van NK-sel Aktiwiteit

Die NK-sel aktiwiteit is bepaal as die mate van  $^{51}\text{Cr}$  wat in die supernatant deur die leukemie afkomstige K562 kanker sellyn (Pross & Jondal, 1975) vrygestel is. Hierdie sellyn is baie sensitief vir NK aktiwiteit. Die gewysigde metode is gevolg soos deur Bouic *et al.* (1996) beskryf is.

##### *Kweking en instandhouding van K562 kankerselle*

Hierdie kankersellyn groei as drywende aggregate in 75 cm<sup>2</sup> weefselkultuurflesse. Die selle is in RPMI 1640 medium (Biowhittaker, Walkersville, Maryland) onderhou wat met 10 % HI FKS, 100 U penisilien/ml en 100 µg streptomisien/ml gesupplementeer is. Die K562 selle is in laasgenoemde medium by 37<sup>0</sup>C in vogtige lug met 'n inhoud van 5 % CO<sub>2</sub> gekweek en is elke derde dag gepasseer.

##### *MNL-suspensie*

'n MNL-suspensie is voorberei soos in 4.2.2 beskryf is en hersuspendeer na 8x10<sup>7</sup> selle/ml. Vyf-en-twintig mikroliter (25 µl) van die MNL-suspensie en 155 µl HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium is in putjies van 'n mikrotiter plaat geplaas. Daarna is 20 µl van die eksperimentele middel (40-100 µg/ml) by ooreenstemmende putjies gevoeg en die mikrotiter plaat is vir 16-18 ure by 37<sup>0</sup>C in vogtige lug met 'n inhoud van 5 % CO<sub>2</sub> geïnkubeer. Kontrole putjies vir die spontane vrystelling van die teikensel voorbereiding het 175 µl HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium ontvang terwyl putjies met 175 µl van 'n 5 % saponien oplossing (Sigma) as kontroles vir die maksimum vrystelling van die teikenselle gedien het.

##### *Voorbereiding van K562 selle vir gebruik in eksperimente*

Die K562 selle is steriel vanuit 'n 75 cm<sup>2</sup> weefselkultuurfles in 'n 15 ml polistireen proefbuis oorgegooi en vir 10 minute teen 200 g gesentrifugeer. Die boonste medium is versigtig afgegooi en die selle is weereens met HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium gewas. Na die laaste wasstap is die onderste sel-konsentraat in 1-2 ml HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium na 8 x 10<sup>5</sup> selle/ml hersuspendeer. Vier milliliter



van laasgenoemde selsuspensie is met 40  $\mu\text{l}$   $^{51}\text{Cr}$  (150  $\mu\text{Ci/ml}$ ) (as chromaat, spesifieke aktiwiteit 50-400  $\text{mCi/mg}$   $^{51}\text{Cr}$ , Amersham International Plc) vir 90 minute by  $37^{\circ}\text{C}$  geïnkubeer terwyl dit stadig geroteer is. Die suspensie is daarna vir 10 minute by 200 g gesentrifugeer, die bostand is versigtig afgegooi en met yskoue HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium opgevol. Hierdie wasstap is vier maal herhaal om alle ongebonde  $^{51}\text{Cr}$  te verwyder. Die gewaste selsuspensie is met 1 ml HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium hersuspendeer en was gereed vir gebruik in die eksperiment.

Na inkubasie van die behandelde MNL-selle, is 25  $\mu\text{l}$  van die  $^{51}\text{Cr}$ -gemerke K562 selsuspensie by al die putjies gevoeg. Die verhouding van effektor:teiken selle was 25:1. Die mikrotiterplaat is liggies geskud en vir 10 minute by 500 g (1600 rpm) gesentifugeer waarna dit vir 4 ure by  $37^{\circ}\text{C}$  in vogtige lug met 'n inhoud van 5 %  $\text{CO}_2$  geïnkubeer is. Elke putjie het daarna 100  $\mu\text{l}$  yskoue HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium ontvang en die plaat is weereens vir 10 minute by 500 g gesentrifugeer. Honderd mikroliter (100  $\mu\text{l}$ ) van die supernatante is in ooreenstemmende gemerke polistireen buisies geplaas en die mate van  $^{51}\text{Cr}$  is met 'n gamma spektrometer (LKB WALLAC) bepaal. Die resultate is uitgedruk as persentasie spesifieke lise wat as volg bepaal is:

$$\% \text{ Spesifieke Lise} = \frac{\text{Toets tellings per minuut (tpm)} - \text{Spontane tpm} \times 100}{\text{Maksimum tpm} - \text{Spontane tpm}}$$

#### **4.2.19 Invloed van die Eksperimentele Middel op die Membraan Stabiliteit van Skaap Eritrosiete**

Die membrane van eritrosiete word algemeen as model om die effek van verskeie faktore, soos temperatuur en geneesmiddels, op selmembrane te bestudeer, gebruik (Becker en Deamer, 1991). Die redes hiervoor is (1) dat eritrosiete maklik in groot hoeveelhede verkrygbaar is en (2) dat die selmembrane van eritrosiete relatiewe eenvoudige strukture is. Eritrosiet selmembrane kan daarom as model vir die meer komplekse membrane van ander selipes gebruik word. 'n Volwasse soogdier eritrosiet besit nie addisionele organelle nie

en verrig min metaboliese prosesse. Dit is essensiël 'n membraan-agtige sakkie hemoglobien (Becker en Deamer, 1991; Voet en Voet, 1995).

Hemoglobien is 'n rooi, suurstof-draende proteïen met 'n molekulêre massa van 64 450. Elke eritosiet besit ongeveer 29 pg hemoglobien. Indien die selmembrane van eritosiete deur geneesmiddels en/of fisiese hantering beskadig word, word die hemoglobien vanuit die selle vrygestel. Hierdie proses staan as hemolise bekend. Die vrygestelde hemoglobien is water-oplosbaar en kleur die omringende medium en/of buffer rooi (Ganong, 1991). Die kleur intensiteit van hierdie vrygestelde hemoglobien kan spektrofotometries by 415 nm bepaal word (Voet & Voet, 1995).

### **Metode**

Die membraan destabiliseringspotensiaal van die eksperimentele middel is met behulp van 'n hemolitiese bepaling gedoen. Hierdie bepaling is voorheen deur Anderson *et al.* (1996) beskryf.

Perifere bloed is vanaf 'n skaap verkry. Honderd milliliter bloed is met 15 ml anti-koagulant, [suur sitraat dekstrose (ACD)], gemeng en by 4<sup>o</sup>C gestoor.

Tydens 'n eksperiment is 2 – 3 ml van die ACD-skaapbloed in 'n 50 ml proefbuis gevoeg. Die proefbuis is met FBS gevul en vir 5 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Na sentrifugasie is die buffer versigtig afgetrek. Die wasstap is nog twee keer herhaal. Na die laaste wasstap is die eritosiet konsentraat onder in die proefbuis tot 'n volume van 5 ml in Hanks gebalanseerde sout-oplossing (pH 7.4, HBSO; Highveld Biological Edm (Bpk) opgemaak. Die hematokrit (% eritosiete in oplossing) is tot 0.5% in HBSO (pH 7.4) aangepas. Honderd mikroliter van die 0.5% eritosiet-oplossing is in al die eksperimentele proefbuise gevoeg. Die verlangde konsentrasie van die eksperimentele middel (5 – 100 µg/ml) is by die eritosiete in die onderskeie proefbuise gevoeg. Die volume in al die proefbuise is tot 0.9 ml met HBSO aangepas. Die eritosiete is vir 30 minute by 37<sup>o</sup>C in die teenwoordigheid van die eksperimentele middel geïnkubeer. 'n Kontrole waar 100% hemolise plaasgevind het, is by die eksperiment ingesluit deur eritosiete te liseer met 'n

hoë konsentrasie van lisofosfatidielcholien (1 mg/ml). Na 30 minute, is die proefbuis vir 5 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Vyftig mikroliter van die supernatant is versigtig afgetrek en in die verlangde putjie van 'n 96-putjie mikrotiter plaat gevoeg. Die volume van die putjies is tot 200  $\mu$ l met FBS aangepas. Die mate van hemolise wat plaasgevind het is spektrofotometries by 415 nm bepaal.

Daar is ook gekorrekteer vir die kleurintensiteit van oksihumaat deur 'n soortgelyke eksperiment op te stel waarin slegs die verskillende konsentrasies van oksihumaat gebruik is. Die waardes hiervan is afgetrek van die oorspronklike eksperimentele waardes en is uiteindelik as 'n persentasie van die 100 % kontrole uitgedruk (% hemolise).

#### **4.2.20 Statistiese bepalings**

Die resultate van elke reeks eksperimente is as die gemiddelde waarde  $\pm$  die standaardfout uitgedruk. Statistiese bepalings binne 'n bepaalde eksperiment is met behulp van die Student t-toets vir gepaarde waardes gedoen. In die *ex vivo* eksperiment is ook van die nie-parametriese Wilcoxon-toets gebruik gemaak.



## **HOOFSTUK 5**

### **RESULTATE**

## 5.1 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PROLIFERASIE VAN MENSLIKE LIMFOSIETE.

Oksihumaat het tot 'n konsentrasie van 100 µg/ml geen effek op rustende limfosiete (beide monosiet-arme en monosiet-ryke) gehad nie. Die proliferatiewe respons van PHA-gestimuleerde, monosiet-ryke limfosiete is egter op 'n dosisafhanklike wyse verhoog en was by oksihumaat konsentrasies van 60 en 80 µg/ml, statisties betekenisvol verhoog ( $p < 0.05$ ) (Figuur 9, bl. 89). 'n Meer opvallende effek is waargeneem wanneer van monosiet-arme PHA-gestimuleerde limfosiete gebruik gemaak is. In hierdie geval het oksihumaat by 40 µg/ml 'n betekenisvolle stimulasie veroorsaak ( $p \leq 0.05$ ) terwyl die stimulasie by konsentrasies van 60-100 µg/ml, hoogs betekenisvol was ( $p \leq 0.001$ ) (Figuur 9, bl. 89).

In 'n vergelykende studie is die effek van humiensuur (natrium sout) en oksihumaat op die proliferasie van monosiet-arme limfosiete ondersoek. Net soos in die geval van oksihumaat, het die kommersiële produk ook geen effek op rustende limfosiete tot 'n konsentrasie van 100 µg/ml gehad nie. In die geval van PHA-gestimuleerde monosiet-arme limfosiete, is die proliferatiewe respons deur al twee eksperimentele middels op 'n dosis-afhanklike wyse verhoog. Humiensuur het by 60 en 80 µg/ml 'n betekenisvolle stimulasie veroorsaak ( $p < 0.05$ ) terwyl die stimulasie by 'n konsentrasie van 100 µg/ml, hoogs betekenisvol was ( $p < 0.0005$ ). In die geval van oksihumaat was die stimulasie by 80 µg/ml betekenisvol ( $p < 0.05$ ) verhoog en by 60 en 100 µg/ml was dit hoogs betekenisvol ( $p < 0.005$  en  $p < 0.0005$ , respektiewelik) verhoog. Hierdie resultate word in Figuur 10 (bl. 90) weergegee.

Die proliferatiewe respons van PHA-gestimuleerde monosiet-ryke limfosiete vanaf HIV-geïnfekteerde persone [verkry vanaf pasiënte wat vir die Fase I studie gekeur was, maar voordat behandeling 'n aanvang geneem het], was statisties hoogs betekenisvol verhoog deur oksihumaat by 20-60 µg/ml ( $p < 0.001$ ) en by 80 µg/ml was die verhoging effens minder betekenisvol ( $p < 0.05$ ). Hierdie resultate word in Figuur 11 (bl. 91) weergegee. Tydens hierdie reeks eksperimente was daar weereens geen betekenisvolle verhoging van PHA-gestimuleerde monosiet-ryke limfosiete afkomstig van gesonde skenkers. Die PHA-



gestimuleerde MNL-proliferasie van HIV-geïnfekteerde individue was ook *ex vivo*, in vergelyking met die plasebo groep, statisties betekenisvol verhoog ( $p < 0.05$ ) na mondelinge inname van 4 g (maar nie 6g) oksihumaat per dag vir twee weke (Figuur 12, bl. 92). Die behandeling van pasiënte met oksihumaat het geen betekenisvolle effek op rustende MNL kulture gehad nie. Die gemiddelde waarde ( $OD_{540}$ ) vir rustende MNL voor behandeling met 4 g oksihumaat, was  $0.2434 \pm 0.0208$  en die waarde na behandeling was  $0.2839 \pm 0.0325$ . Wanneer pasiënte met 6 g oksihumaat behandel is, was die waardes ( $OD_{540}$ ) vir rustende MNL voor behandeling  $0.3099 \pm 0.0814$  en na behandeling  $0.2077 \pm 0.0643$ . Die resultate weergegee in Figuur 12 (bl. 92) is bereken vanaf gestimuleerde - **minus** rustende waardes. Statistiese bepaling is met behulp van die Student t-toets vir gepaarde waardes gedoen en is met die nie-parametriese Wilcoxon-toets bevestig.

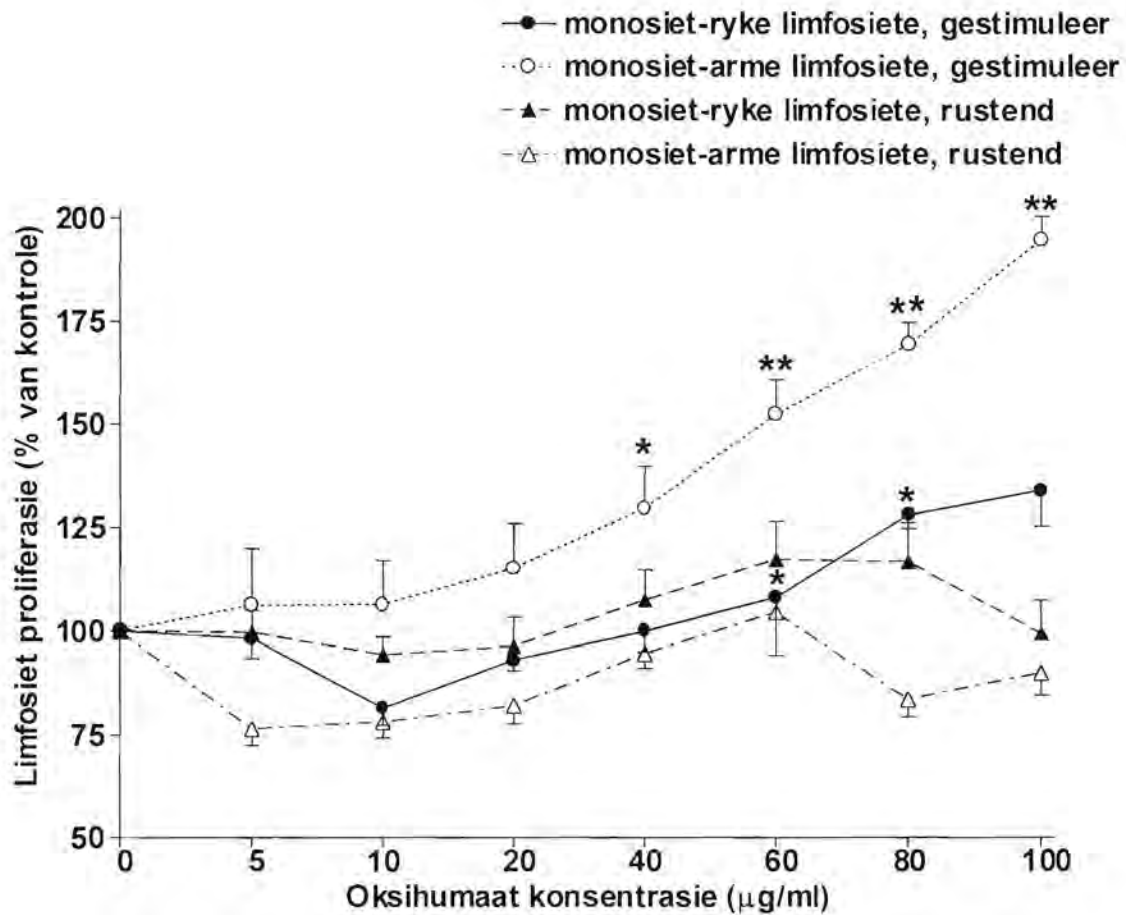
## **5.2. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN IL-2 DEUR MENSlike LIMFOSIETE.**

Aangesien IL-2 vlakke in rustende limfosiete baie laag is en moeilik bepaal kan word, is slegs PHA-gestimuleerde limfosiete gebruik. Oksihumaat het 'n stimulerende invloed op die produksie van IL-2 deur PHA-gestimuleerde limfosiete gehad en was by 'n konsentrasie van 100  $\mu\text{g/ml}$  statisties betekenisvol verhoog ( $p < 0.05$ ). Hierdie resultate word in Figuur 13 (bl. 93) weergegee.

## **5.3. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE UITDRUKKING VAN CD25, CD38 EN HLA-DR OP MENSlike LIMFOSIETE.**

Oksihumaat het tot 100  $\mu\text{g/ml}$  geen effek op die rangskikking van die verskillende sel populasies op die verspreidingsgrafiek gehad nie. In die geval van rustende limfosiete, het oksihumaat (100  $\mu\text{g/ml}$ ) geen effek op die uitdrukking van CD25 (die IL-2-reseptor), CD38 ('n molekule wat by sein transduksie en sellulêre vashegting betrokke is) sowel as HLA-DR getoon nie (Figuur 14, bl. 94). Die uitdrukking van CD25 deur PHA-gestimuleerde limfosiete wat met 100  $\mu\text{g/ml}$  oksihumaat behandel is, was egter statisties betekenisvol

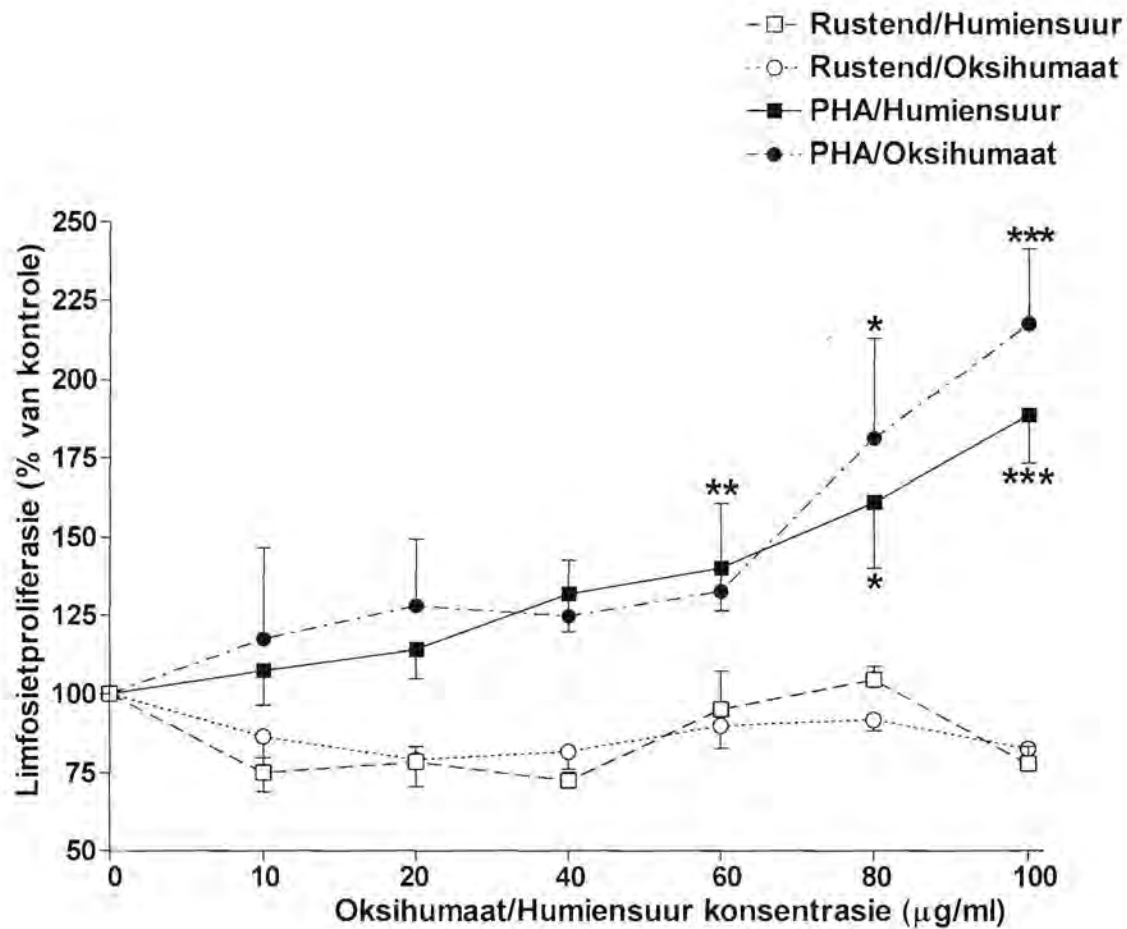
verhoog ten opsigte van onbehandelde kontrole waardes ( $p < 0.05$ ), terwyl die uitdrukking van CD38 onveranderd gebly het. Daar was wel 'n verlaging in die uitdrukking van HLA-DR na oksihumaat behandeling. Hierdie verlaging was egter nie statisties betekenisvol nie.



**Figuur 9:** Die effek van 'n 72 uur lange behandeling van oksihumaat op die proliferatiewe respons van rustende- en PHA-gestimuleerde limfosiete (monosiet-ryke en monosiet-arme limfosiete). Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.001$

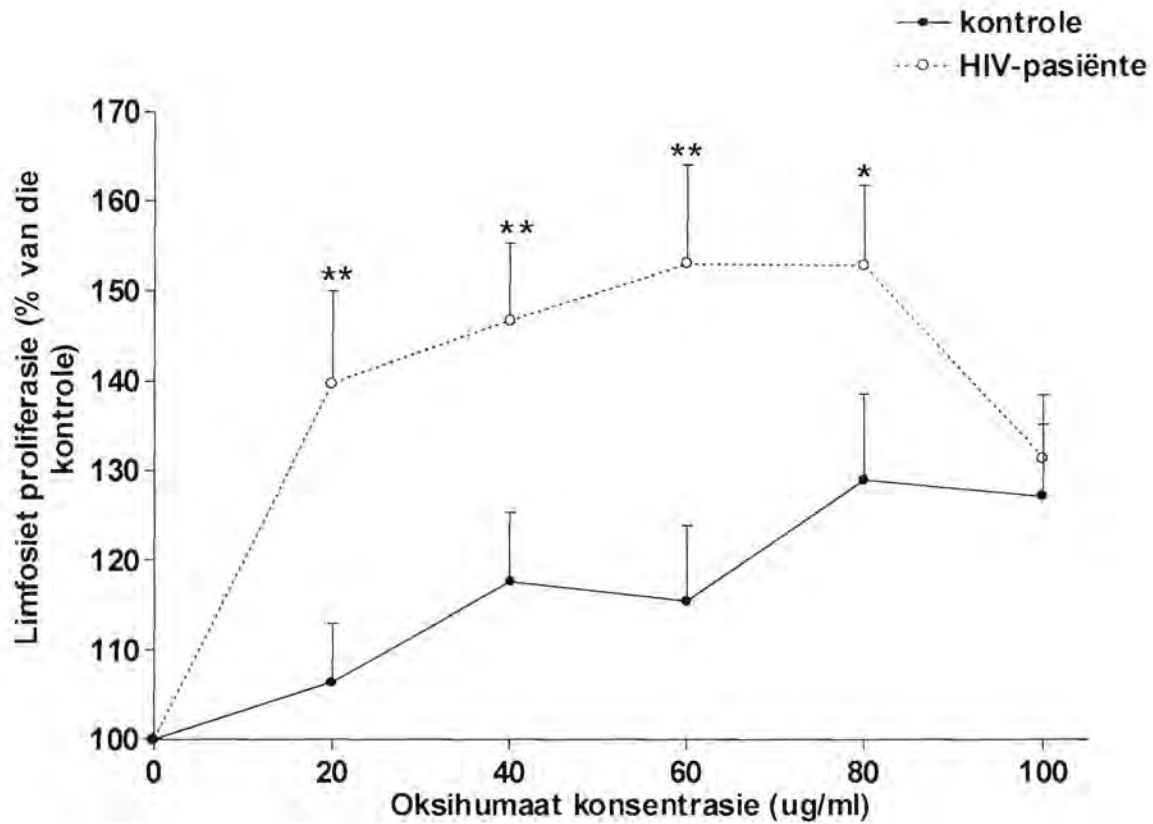


**Figuur 10:** Die effek van 'n 72 uur lange behandeling van oksihumaat (ENERKOM [Pty] Ltd) en humiensuur (natrium sout, Aldrich-Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI USA) op die proliferatiewe respons van rustende- en PHA-gestimuleerde monosiet-arme limfosiete. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 8 herhalings met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.005$

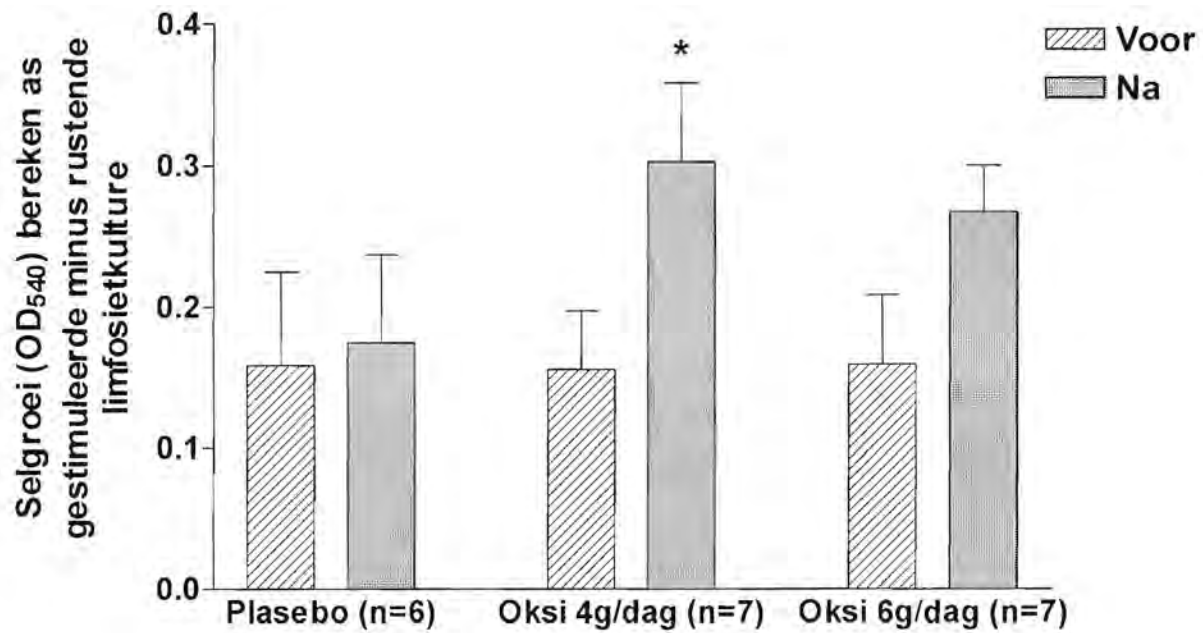
\*\*\*  $p < 0.0005$



**Figuur 11:** Die effek van 'n 72 uur lange behandeling van oksihumaat op die proliferatiewe respons van PHA-gestimuleerde, monosiet-ryke limfosiëte van gesonde kontrole persone sowel as van HIV-geïnfekteerde pasiënte. Limfosiëte van 8 normale kontrole persone sowel as limfosiëte van 20 HIV-geïnfekteerde pasiënte is in hierdie eksperimente gebruik. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde persentasie proliferasie ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

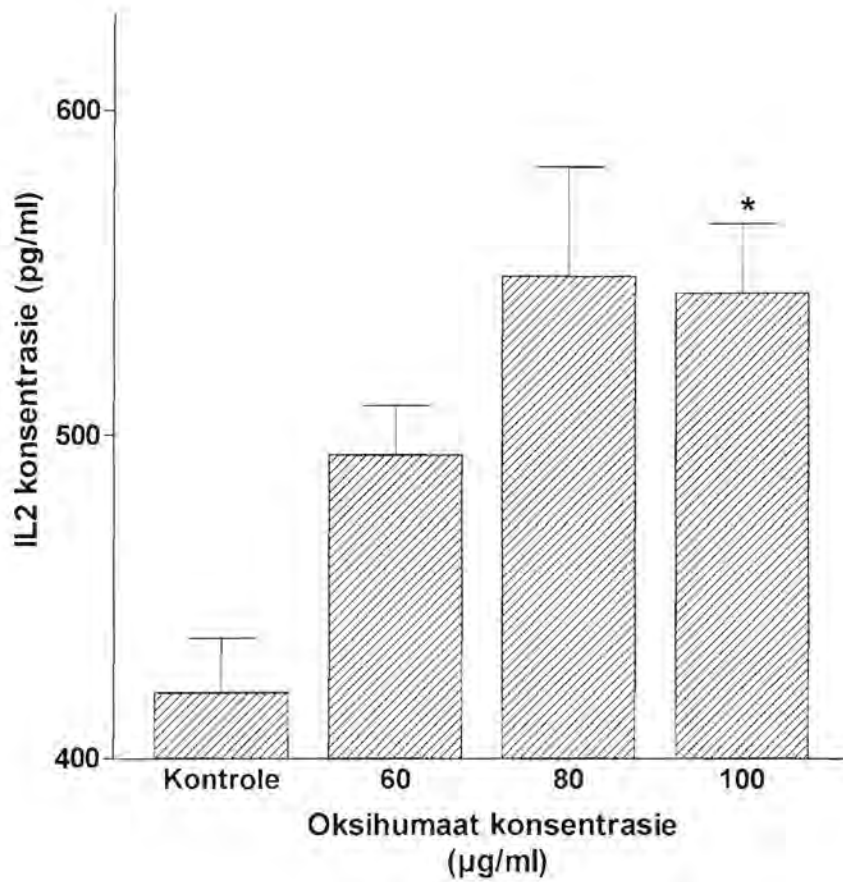
\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.001$



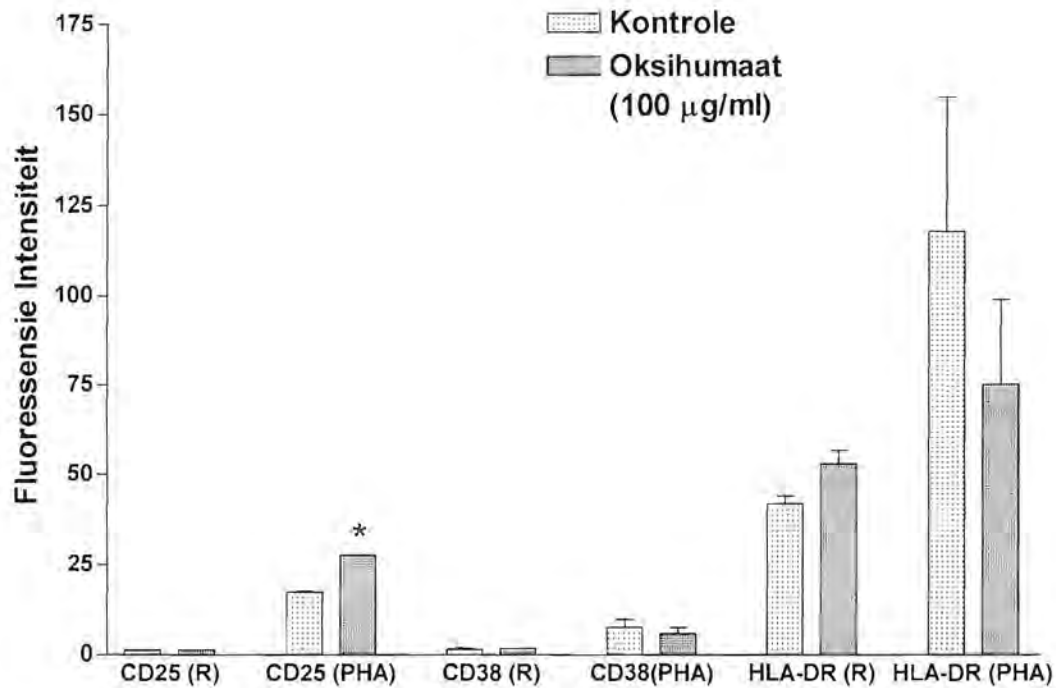
**Figuur 12:** Effek van 'n twee week lange behandeling met oksihumaat op die proliferatiewe respons van limfosiete vanaf HIV-positiewe pasiënte. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$



**Figuur 13:** Effek van 'n 48 uur lange behandeling met oksihumaat op interleukien 2 produksie deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate word weergegee as gemiddelde waardes van 4 verskillende eksperimente in duplikaat, met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$



**Figuur 14:** Die effek van 'n 72 uur lange behandeling met oksihumaat op die uitdrukking van CD25, CD38 en HLA-DR op PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate is as die gemiddelde fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal getal) met standaardfoutbalkies, wat in 3 eksperimente waargeneem is, uitgedruk. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$

#### **5.4. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN IL-4 DEUR MENSLIKE LIMFOSIETE.**

Slegs gestimuleerde limfosiete is gebruik as gevolg van die baie lae vlakke van IL-4 in rustende limfosiete. Die produksie van IL-4 deur PHA-gestimuleerde limfosiete is op 'n dosis-afhanklike manier deur oksihumaat gestimuleer (Figuur 15, bl. 96). Die stimulasie was, ten opsigte van onbehandelde kontrole waardes, statisties betekenisvol by oksihumaat konsentrasies van 80 µg/ml ( $P < 0.05$ ) en 100 µg/ml ( $P < 0.01$ ).

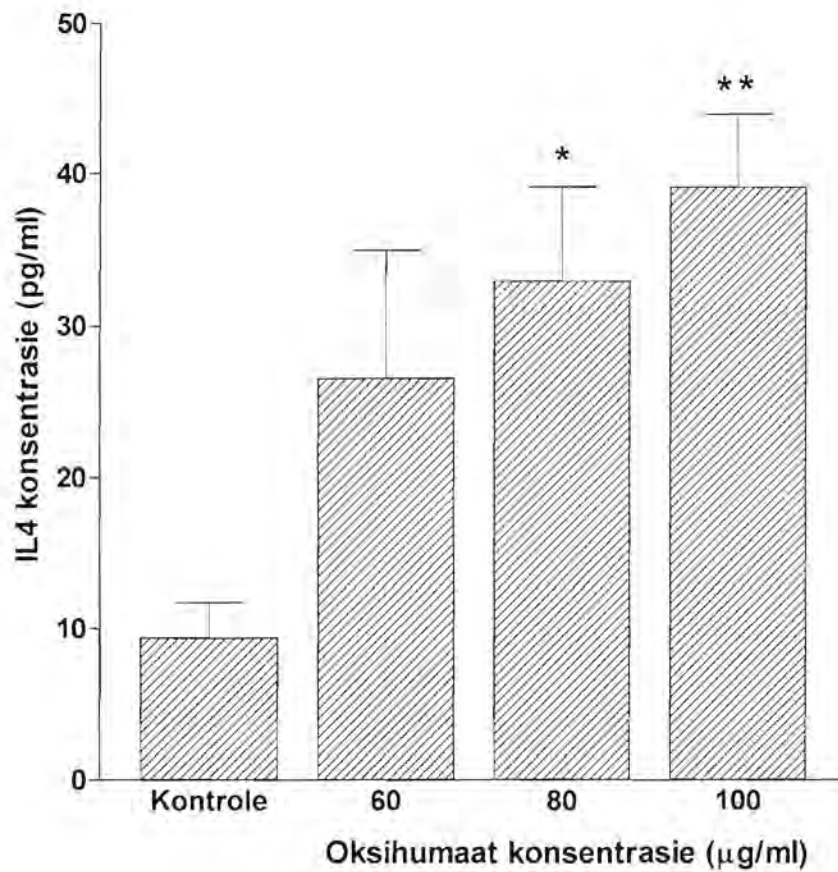
#### **5.5. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN IL-6 DEUR MENSLIKE LIMFOSIETE.**

Oksihumaat het geen effek op die produksie van IL-6 deur PHA-gestimuleerde limfosiete gehad nie. Die gemiddelde IL-6 waardes van rustende kontroles was  $3287 \pm 2681$  pg/ml terwyl dit vir PHA-gestimuleerde kontroles  $38420 \pm 12020$  pg/ml was. Die resultate van 3 verskillende eksperimente word in Figuur 16 (bl. 97) weergegee.

#### **5.6. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN IL-10 DEUR MENSLIKE LIMFOSIETE.**

Die effek wat oksihumaat op die produksie van IL-10 deur PHA-gestimuleerde limfosiete gehad het, word in Figuur 17 (bl. 98) aangetoon. Oksihumaat (60, 80 en 100 µg/ml) het die produksie van IL-10 by al drie konsentrasies tot by die vlak wat met rustende selle waargeneem is, geïnhibeer. Hierdie inhibisie was by al die konsentrasies statisties betekenisvol ten opsigte van gestimuleerde onbehandelde kontroles ( $P < 0.01$ ). Die gemiddelde waardes van rustende en gestimuleerde kontroles was onderskeidelik  $0.7450 \pm 0.0876$  pg/ml en  $3.301 \pm 0.2785$  pg/ml. Die resultate van 3 afsonderlike eksperimente word in Figuur 17 (bl. 98) weergegee.

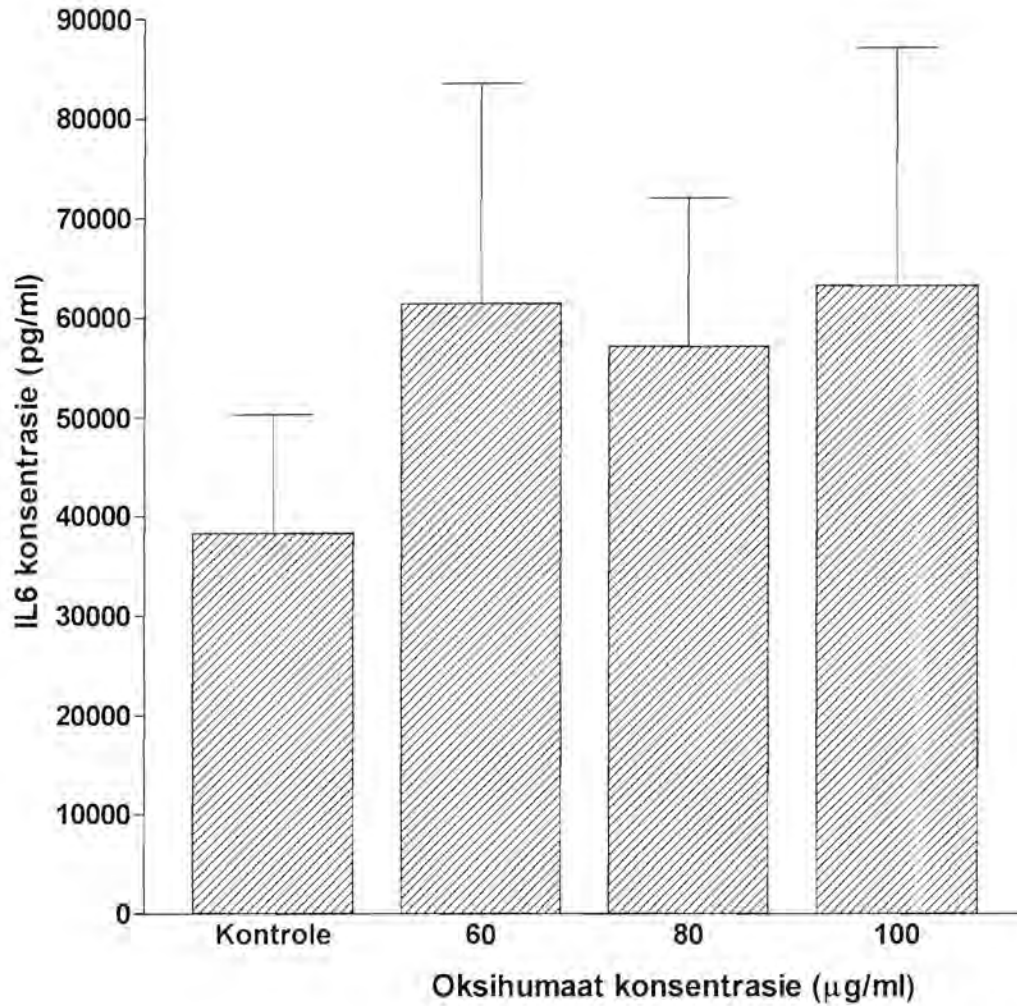




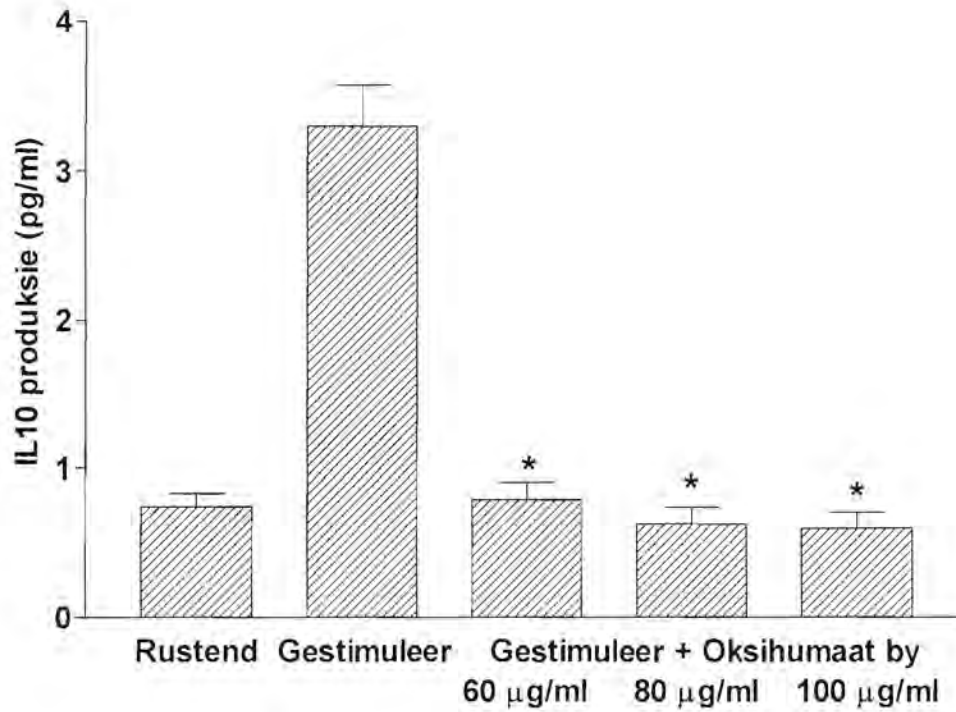
**Figuur 15:** Die effek van 'n 24 uur lange behandeling met oksihumaat op interleukien 4 produksie deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van 3 verskillende eksperimente, wat in duplikaat gedoen is, met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.01$



**Figuur 16:** Die effek van oksihumaat op interleukien 6 produksie deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van 3 verskillende eksperimente met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrolle waardes.



**Figuur 17:** Die effek van oksihumaat op interleukien 10 produksie deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate word as gemiddelde waardes van 3 afsonderlike eksperimente, met standaardfoutbalkies, weergegee. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.01$

### **5.7. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN TNF- $\alpha$ DEUR MENS LIKE LIMFOSIETE.**

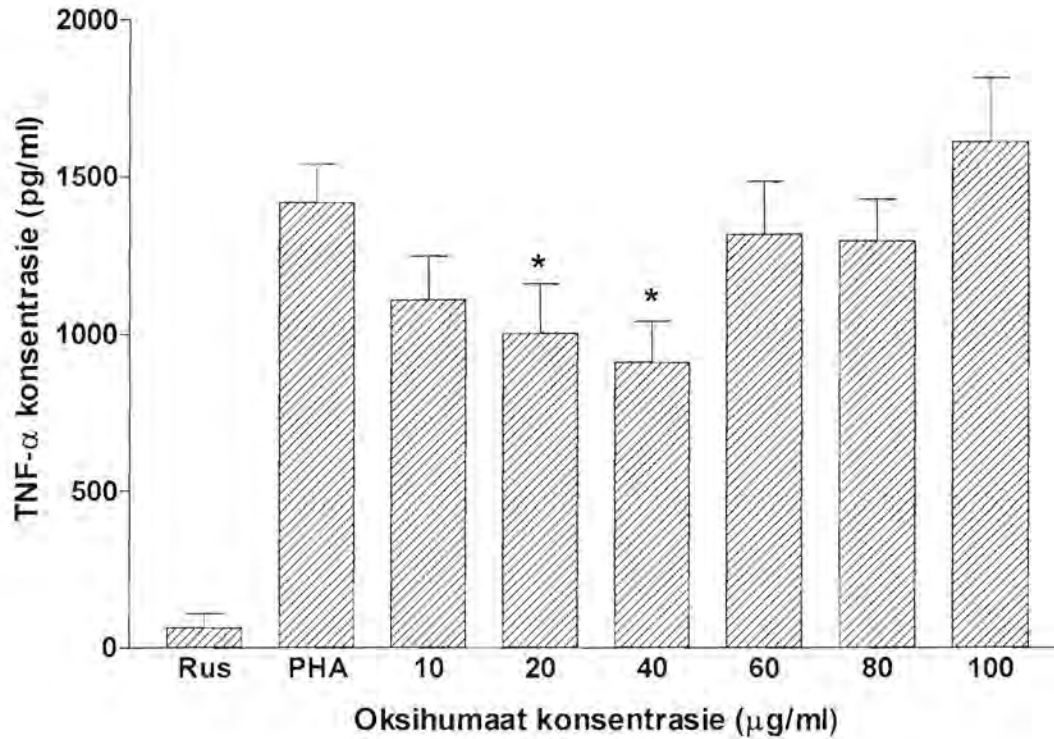
Die resultate verkry in 3 verskillende eksperimente, word in Figuur 18 (bl 100) aangetoon. Alhoewel oksihumaat by 20 en 40  $\mu\text{g/ml}$  'n betekenisvolle inhibisie ( $p < 0.05$ ) van PHA-gestimuleerde limfosiete veroorsaak het, is daar geen duidelike patroon met die ander konsentrasies ten opsigte van kontrole waardes, waargeneem nie. Die gemiddelde waardes van rustende en PHA-gestimuleerde kontrole sisteme was  $18.59 \pm 12.20$  en  $1383 \pm 109.9$  pg/ml TNF- $\alpha$ , respektiewelik.

### **5.8. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN IFN- $\gamma$ DEUR MENS LIKE LIMFOSIETE.**

Oksihumaat-konsentrasies van 20-100  $\mu\text{g/ml}$  het geen statisties betekenisvolle effek op die produksie van IFN- $\gamma$  deur PHA-gestimuleerde limfosiete gehad nie. Mitogeen-gestimuleerde limfosiete het wel betekenisvol meer van die faktor vrygestel wanneer dit met rustende selle vergelyk is (sien Figuur 19, bl.101). Die IFN- $\gamma$  waardes van rustende en PHA-gestimuleerde kontrole sisteme, was onderskeidelik  $0.220 \pm 0.079$  pg/ml en  $20.851 \pm 8.716$  pg/ml.

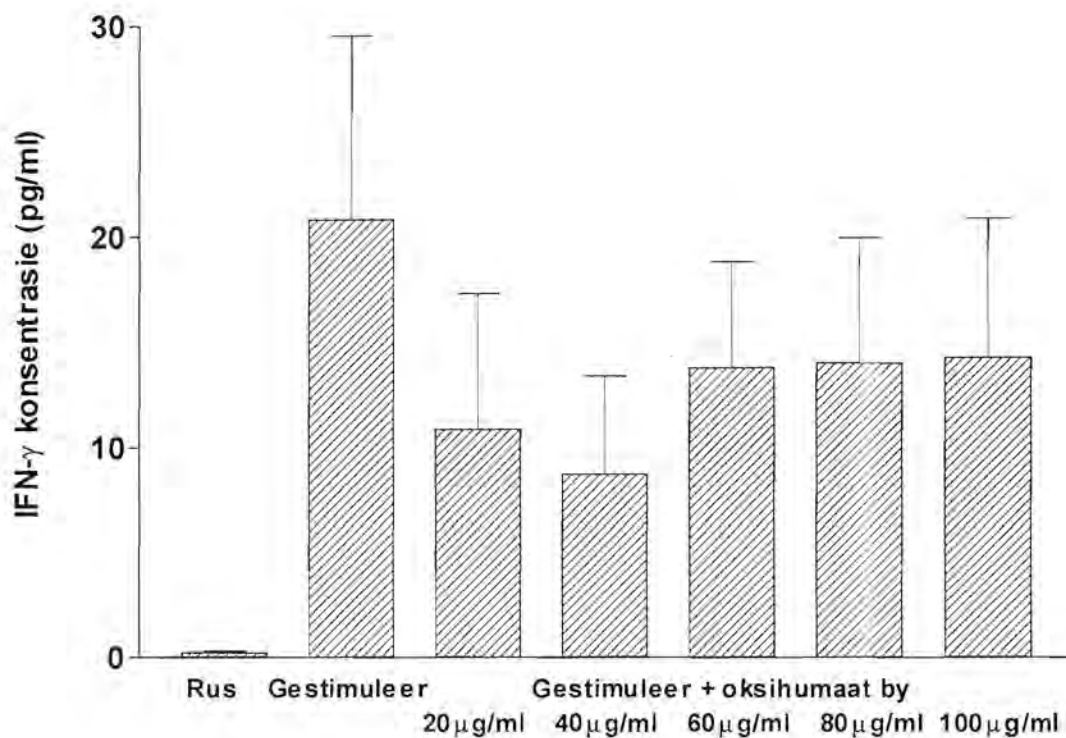
### **5.9. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN PGE<sub>2</sub> DEUR MENS LIKE LIMFOSIETE.**

Die resultate in Figuur 20 (bl. 102) toon die gemiddelde waardes van agt herhalings. Oksihumaat (60, 80 en 100  $\mu\text{g/ml}$ ) het PGE<sub>2</sub>-produksie deur FMA-gestimuleerde limfosiete met tussen 20-30% ten opsigte van die onbehandelde kontroles, geïnhibeer. Laasgenoemde inhibisie was egter nie betekenisvol nie. Onbehandelde kontrole limfosiete is met 400 % deur FMA gestimuleer. Die resultate vir die rustende kontrole sisteem en die

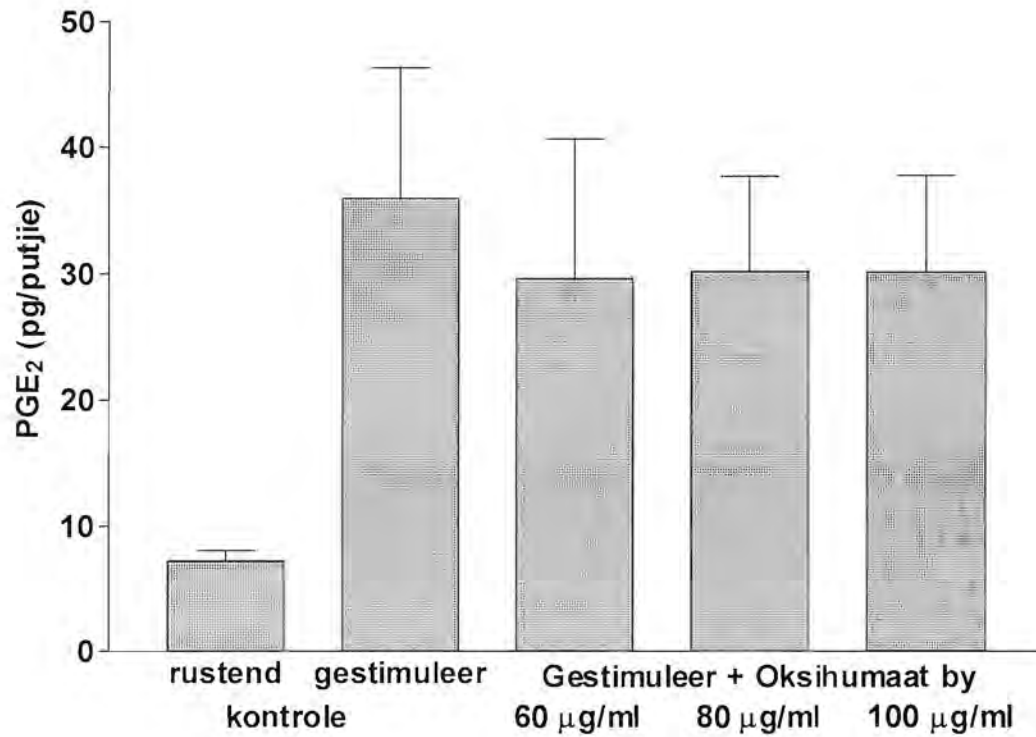


**Figuur 18:** Die effek van oksihumaat op die produksie van tumor nekrose faktor alfa deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate word as gemiddelde waardes van 5 eksperimente met standaardfoutbalkies, weergegee. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$



**Figuur 19:** Die effek van 'n 72 uur lange behandeling met oksihumaat op die produksie van interferon gamma deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van 4 afsonderlike eksperimente met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.



**Figuur 20:** Die effek van 'n 20 minuut lange behandeling met oksihumaat op die produksie van prostaglandien E<sub>2</sub> deur FMA-gestimuleerde limfosiete. Die resultate toon die gemiddelde waardes van vier herhalings met standaardfoutbalkies en word weergegee as pg/putjie. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

FMA-gestimuleerde kontrole sisteem, was onderskeidelik  $7.20 \pm 0.866$  en  $35.98 \pm 10.35$  pg/putjie.

#### **5.10 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN LTB<sub>4</sub> DEUR MENSLIKE LIMFOSIETE**

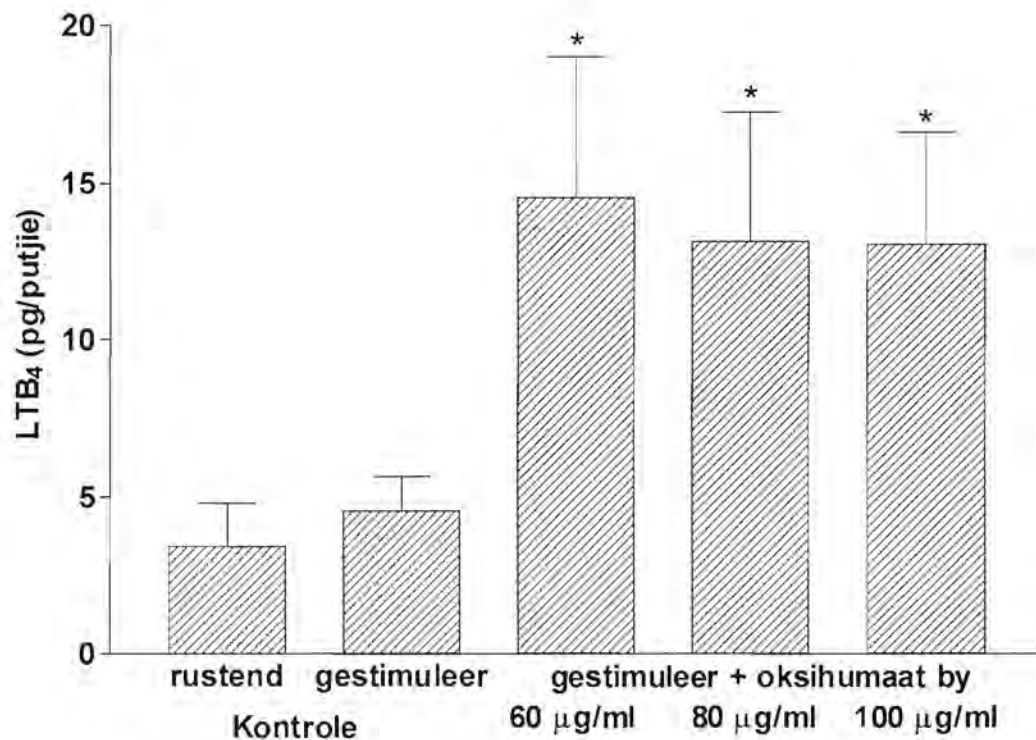
Die resultate in Figuur 21 (bl 104) toon die gemiddelde waardes van vier herhalings. Oksihumaat het LTB<sub>4</sub>-produksie deur FMA-gestimuleerde limfosiete met meer as 300% ten opsigte van die onbehandelde kontroles, gestimuleer. Hierdie stimulasie was by oksihumaat konsentrasies van 60, 80 en 100 µg/ml statisties betekenisvol verhoog ( $p < 0.05$ ). Die gemiddelde waardes vir rustende kontroles en FMA-gestimuleerde kontroles was onderskeidelik  $3,450 \pm 1.373$  en  $4,550 \pm 1.108$  pg/putjie. Onbehandelde kontroles is slegs met 32% deur FMA gestimuleer en kan daaraan toegeskryf word dat die metode wat vir hierdie bepaling gebruik is, optimaal was vir PGE<sub>2</sub> produksie.

#### **5.11 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE UITDRUKKING VAN CR3-MOLEKULES OP MENSLIKE NEUTROFIELE.**

Oksihumaat het geen effek gehad op die rangskikking van die verskillende sel populasies op die verspreidingsgrafiek nie. Die uitdrukking van CR3 vashegtingsmolekules deur onbehandelde neutrofiele is met 218 % deur FMA gestimuleer. Oksihumaat (10 – 100 µg/ml) het die CR3 vashegtingsmolekules op FMA-gestimuleerde neutrofiele hoogs betekenisvol geïnhibeer, terwyl rustende neutrofiele effens gestimuleer is (Figuur 22, bl. 105). Oksihumaat het deurgaans 'n dosis-afhanklike inhibisie van CR3-uitdrukking op gestimuleerde, maar nie rustende neutrofiele, veroorsaak. In die geval waar 10 tot 40 µg/ml oksihumaat gebruik is, was die inhibisie statisties betekenisvol ( $p < 0.05$  in die geval van 10 en 20 µg/ml en  $p < 0.005$  in die geval 40 µg/ml) terwyl 60 tot 100 µg/ml oksihumaat die uitdrukking van CR3 ten opsigte van die kontroles, hoogs betekenisvol ( $p < 0.0005$ ) geïnhibeer het. Die CR3-uitdrukking van rustende neutrofiele is by oksihumaat konsentrasies van 10 tot 40 µg/ml betekenisvol gestimuleer.

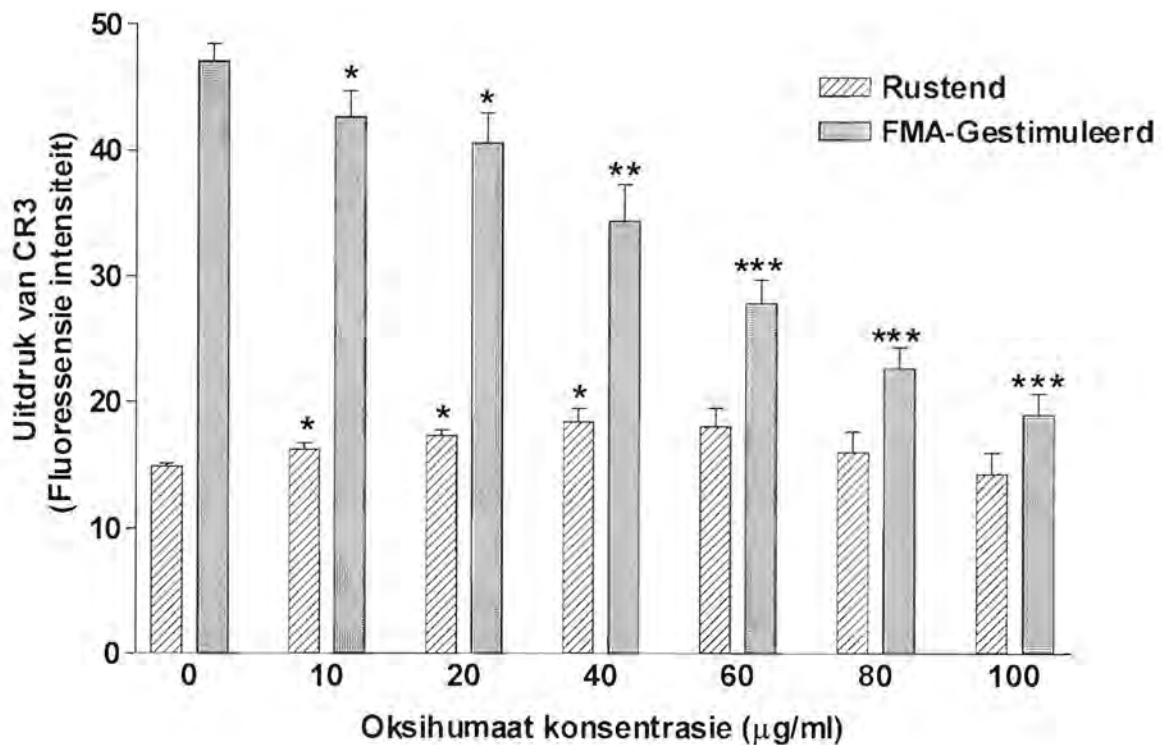


Soortgelyke resultate is met FMLF:SB as stimulant getoon en word in Figuur 23 (bl. 106) weergegee. In hierdie geval het oksihumaat ook die uitdrukking van CR3 deur gestimuleerde, maar nie rustende neutrofiële op 'n dosisafhanklike wyse geïnhibeer. Laasgenoemde inhibisie was egter slegs statisties betekenisvol laer as die onbehandelde kontroles by 'n oksihumaat-konsentrasies van 100 µg/ml ( $p < 0.05$ ). 'n Konsentrasie van 10 µg/ml oksihumaat het egter 'n betekenisvolle stimulasie van CR3 op gestimuleerde neutrofiële veroorsaak. Oksihumaat het die CR3 uitdrukking van rustende neutrofiële ook effens gestimuleer, maar in hierdie geval was die stimulasie nie betekenisvol nie. Die uitdrukking van CR3 deur onbehandelde kontroles, is met 63% deur FMLF:SB gestimuleer.



**Figuur 21:** Die effek van 'n 20 minuut lange behandeling met oksihumaat op die produksie van leukotriene B<sub>4</sub> deur FMA-gestimuleerde limfosiete. Die resultate toon die gemiddelde waardes van vier herhalings met standaardfoutbalkies en word weergegee as pg/putjie. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$

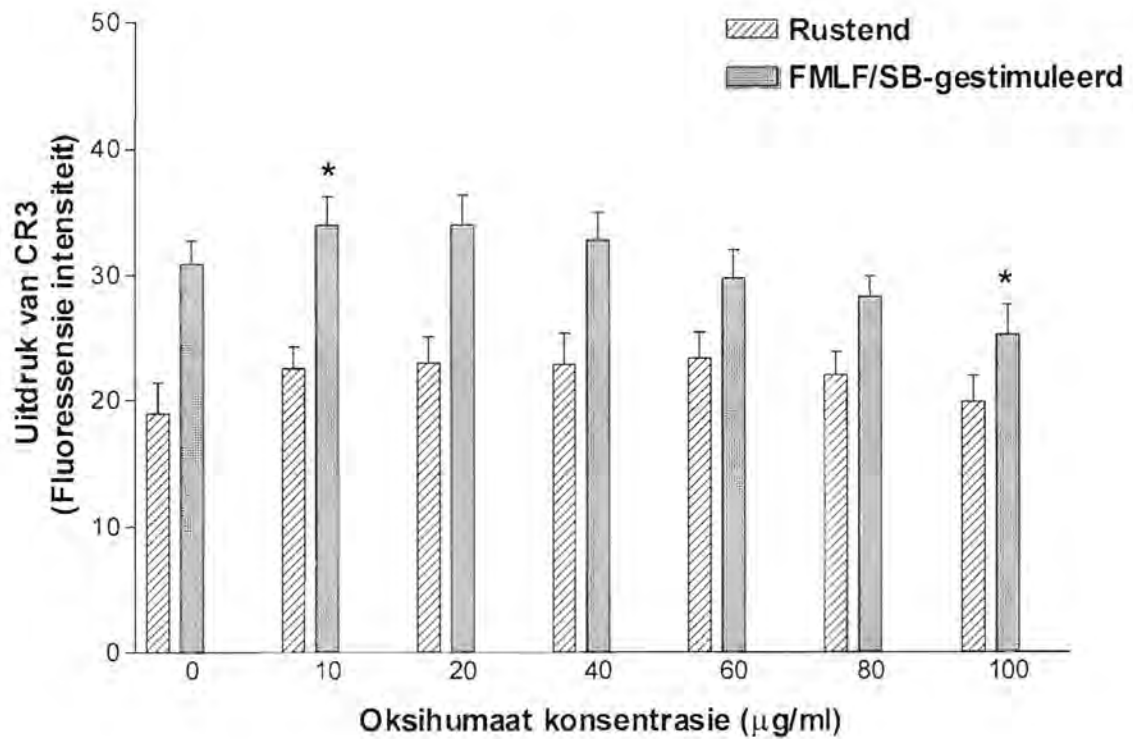


**Figuur 22:** Effek van 'n 30 minuut lange behandeling met oksihumaat op die uitdrukking van CR3 deur rustende en FMA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate is as die gemiddelde fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal getal; "median channel number") met standaardfoutbalkies, wat in vyf eksperimente waargeneem is, uitgedruk. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\* p<0.05

\*\* p<0.005

\*\*\* p<0.0005



**Figuur 23:** Die effek van 'n 30 minuut lange behandeling met oksihumaat op die uitdrukking van CR3 deur rustende sowel as FMLF:SB-gestimuleerde menslike neutrofiel. Die resultate is as die gemiddelde fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal getal; “median channel number”) met standaardfoutbalkies, wat in vier eksperimente waargeneem is, uitgedruk. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

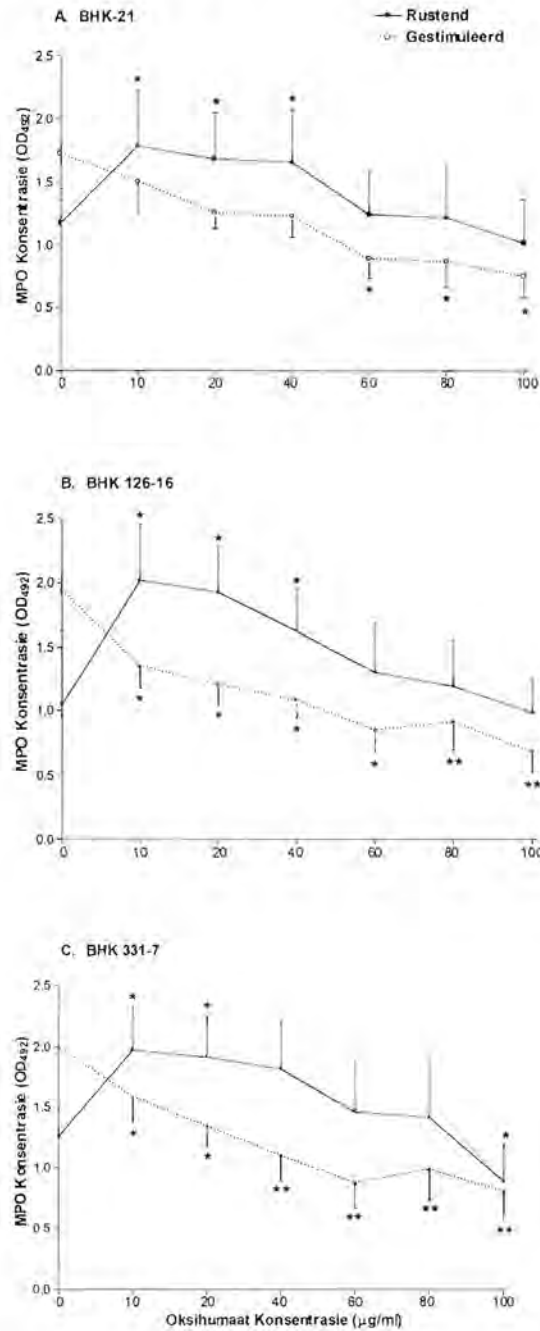
\* $p < 0.05$

## 5.12 EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP NEUTROFIEL VASHEGTING AAN NORMALE EN GETRANSFEKTEERDE FIBROBLAST SELLYNE.

Die effek wat oksihumaat op die vashegting van rustende sowel as FMA-gestimuleerde neutrofiële aan 'n normale baba hamster niersellyn (BHK-21) (uitgedruk as totale MPO-vrystelling nadat die selle geliseer is) uitgeoefen het, word in Figuur 24A (bl. 108) weergegee. Oksihumaat het die vashegting van rustende neutrofiële aan BHK-21-selle by konsentrasies van 10-40  $\mu\text{g/ml}$  betekenisvol verhoog ( $p < 0.05$ ) terwyl die vashegting van FMA-gestimuleerde neutrofiële by 60-100  $\mu\text{g/ml}$  betekenisvol geïnhibeer is ( $p < 0.05$ ). Die optiese digtheidslesing (OD-lesing) van rustende neutrofiële was  $1.180 \pm 0.267$  terwyl hierdie lesing vir FMA-gestimuleerde neutrofiële, na  $1.728 \pm 0.376$  verhoog is (68% stimulasie).

Oksihumaat het ook 'n inhibisie van neutrofiel vashegting aan die 2 verskillende getransfekteerde BHK-sellyne, naamlik BHK 126-16 en BHK 331-7, veroorsaak. Hierdie resultate verskyn in Figuur 24B en C (bl. 108). Die vashegting van rustende neutrofiële aan BHK 126-16 selle, wat menslike E-selektien op sy oppervlakte uitdruk, is ook deur oksihumaat konsentrasies van 10-40  $\mu\text{g/ml}$  gestimuleer ( $p < 0.05$ ). Vashegting van FMA-gestimuleerde neutrofiële aan hierdie sellyn, is deur oksihumaat konsentrasies van 10-60  $\mu\text{g/ml}$  statisties betekenisvol ( $p < 0.05$ ) geïnhibeer terwyl konsentrasies 80 en 100  $\mu\text{g/ml}$  die vashegting statisties hoogs betekenisvol geïnhibeer het ( $p < 0.005$ ) (Figuur 24B). Die OD-lesing vir rustende onbehandeld neutrofiële was  $1.044 \pm 0.155$  en hierdie lesing is vir FMA-gestimuleerde onbehandelde neutrofiële na  $1.937 \pm 0.305$  verhoog (54 % stimulasie).

In die geval van BHK 331-7 selle, wat menslike ICAM-1 op sy oppervlakte uitdruk, het oksihumaat by konsentrasies van 10 en 20  $\mu\text{g/ml}$  die vashegting van rustende neutrofiële aan hierdie sellyn, gestimuleer ( $p < 0.05$ ). Die vashegting van FMA-gestimuleerde neutrofiële aan hierdie sellyn was by oksihumaat konsentrasies van 10 en 20  $\mu\text{g/ml}$



**Figuur 24:** Die effek van oksihumaat op vashegting van rustende en FMA-gestimuleerde neutrofiële aan normale (A: BHK-21) en 2 getransfekteerde fibroblast sellyne (B: BHK 126-16 en C: BHK 331-7). Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van drie verskillende eksperimente met standaardfoutbalkies.

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.005$

statisties betekenisvol geïnhibeer, terwyl konsentrasies van 40-100 µg/ml vashegting selfs hoogs betekenisvol geïnhibeer het ( $p \leq 0.0001$ ) (sien Figuur 24C). Die OD-lesing vir rustende onbehandeld neutrofiele was  $1.257 \pm 0.223$  en hierdie lesing is vir FMA-gestimuleerde onbehandelde neutrofiele na  $2.005 \pm 0.338$  verhoog (63% stimulasie).

### **5.13 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE VRYSTELLING VAN EOSINOFILIESE KATIONIESE PROTEÏENE (EKP) DEUR MENSLIKE EOSINOFIELE.**

Die mate van vrygestelde eosinofiliese kationiese proteïene was 'n indikasie van eosinofiel degranulasie en die resultate van drie verskillende eksperimente word in Figuur 25 (bl. 111) weergegee. Oksihumaat het die vrystelling van EKP deur FMLF:SB- sowel as geöpsoneerde Sephadex-gestimuleerde eosinofiele op 'n dosisafhanklike manier geïnhibeer. Wanneer geöpsoneerde Sephadex krale as stimulant gebruik is, was die inhibisie statisties nie betekenisvol nie, maar EKP-vrystelling deur FMLF:SB-gestimuleerde eosinofiele is egter by oksihumaat konsentrasies van 80 en 100 µg/L wel betekenisvol geïnhibeer ( $p < 0.05$ ). Die rustende kontrolewaardes waar FMLF:SB as stimulant gebruik is, was  $9.125 \pm 3.411$  µg/L EKP, terwyl die rustende kontrolewaardes waar van geöpsoneerde Sephadex krale as stimulant gebruik gemaak is,  $6.454 \pm 1.425$  µg/L was. Wanneer resultate verkry met FMLF:SB gestimuleerde eosinofiele met die rustende waardes vergelyk word, het oksihumaat by 'n konsentrasie van 100 µg/L die vrystelling van EKP deur gestimuleerde eosinofiele tot die vlak van rustende selle geïnhibeer.

### **5.14 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE VRYSTELLING VAN MIËLOPEROKSIDASE (MPO) DEUR MENSLIKE NEUTROFIELE.**

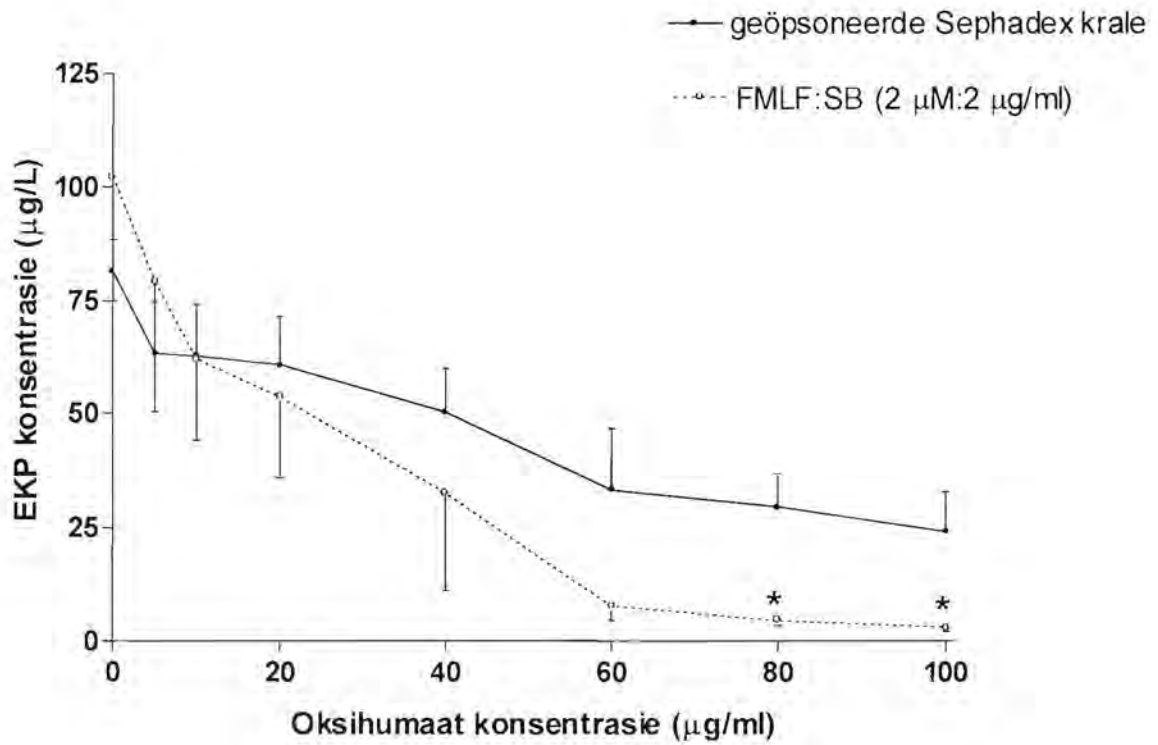
'n Standaard metode om die mate van MPO-vrystelling te bepaal, wat op neutrofiel degranulasie dui, is uitgevoer. 'n Kombinasie van twee stimulant, naamlik FMLF en SB, is deurgaans by konsentrasies van 2 µM en 2 µg/ml respektiewelik, gebruik.

Die MPO eksperiment is drie maal met geöpsoneerde Sephadex krale as stimulant herhaal, terwyl eksperimente waar FMLF:SB as stimulant gebruik is, twaalf maal gedoen is. Die spektrofotometriese lesings is in triplikaat gedoen.

Volgens Figuur 26 (bl. 112) kan duidelik waargeneem word dat oksihumaat die vrystelling van MPO deur FMLF:SB- sowel as geöpsoneerde Sephadex-gestimuleerde neutrofiële, op 'n dosisafhanklike wyse geïnhibeer het. Oksihumaat het die vrystelling van MPO deur FMLF:SB-gestimuleerde neutrofiële by konsentrasies van 40 en 60 µg/ml statisties betekenisvol ( $p < 0.05$ ) geïnhibeer terwyl die inhibisie by konsentrasies van 80 en 100 µg/ml hoogs betekenisvol was ( $p < 0.005$ ). Wanneer neutrofiële egter met Sephadex krale gestimuleer is, was die inhibisie nie betekenisvol nie. Die waardes vir rustende MPO vlakke van die FMLF:SB gestimuleerde eksperimente was  $0.02214 \pm 0.0019$  mU en  $0.0315 \pm 0.0005$  mU in die geval waar geöpsoneerde Sephadex krale as stimulant gebruik is.

### **5.15 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE SITOTOKSIESE AKTIWITEIT VAN MENSLIKE LIMFOSIETE.**

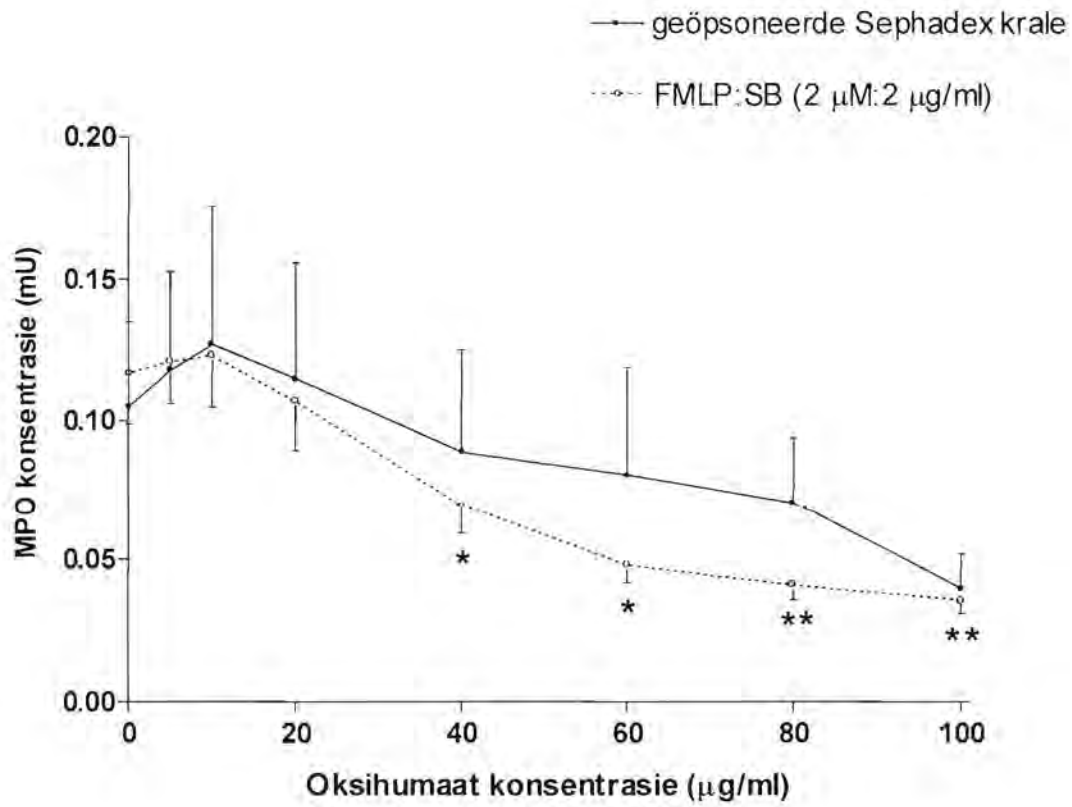
Die resultate van drie verskillende eksperimente word in Figuur 27 (bl. 113) aangetoon. Die groei van PLC-selle is op 'n dosisafhanklike wyse deur oksihumaat (10-100 µg/ml) geïnhibeer maar was slegs by 'n konsentrasie van 100 µg/ml statisties betekenisvol ( $p < 0.05$ ). Wanneer menslike limfosiëte egter by die sisteem gevoeg is, is die mate van inhibisie indrukwekkend verhoog. In hierdie geval is die groei van PLC-selle by 'n oksihumaatkonsentrasie van 10 µg/ml statisties betekenisvol geïnhibeer ( $p < 0.05$ ), terwyl konsentrasies van 20-100 µg/ml statisties 'n hoogs betekenisvolle inhibisie ( $p < 0.005$ ) veroorsaak het.



**Figuur 25:** Die effek van 'n 15 minuut lange behandeling met oksihumaat op die vrystelling van eosinofiliese kationiese proteïene (EKP) deur FMLF:SB- sowel as geöpsoneerde Sephadex-gestimuleerde menslike eosinofiele. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van drie verskillende eksperimente met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$

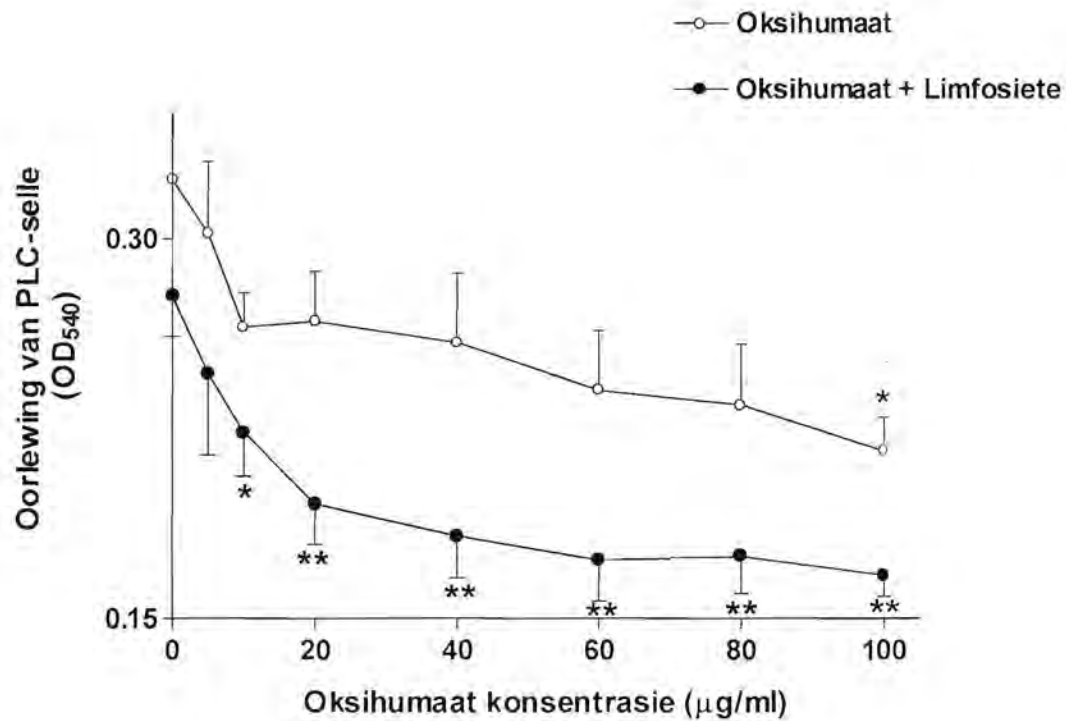




**Figuur 26:** Die effek van 'n 15 minuut lange behandeling met oksihumaat op die vrystelling van miëloperoksidase (MPO) deur FMLF:SB- sowel as geöpsoneerde Sephadex-gestimuleerde menslike neutrofiële. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van twaalf herhalings met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.005$



**Figuur 27:** Die effek van 'n 72 uur lange behandeling met oksihumaat op die groei van 'n lewercancer sellyn (PLC) in die teenwoordigheid of afwesigheid van menslike limfosiete. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van ses tot nege herhalings met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.005$

## 5.16 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP NK-SEL AKTIWITEIT.

Die NK-sel aktiwiteit, uitgedruk as spesifieke lise van  $^{51}\text{Cr}$ -gelaaide K562 kankerselle wat met limfosiete geïnkubeer is, word in Tabel 2 aangetoon. Oksihumaat het by konsentrasies van 60 en 100  $\mu\text{g/ml}$  spesifieke lise van die teikenselle, ten opsigte van onbehandelde kontroles, betekenisvol geïnhibeer ( $p < 0.005$ ).

**Tabel 2:** Die effek van 'n 16 uur lange behandeling met oksihumaat op NK-sel aktiwiteit soos bepaal deur persentasie spesifieke lise van K562  $^{51}\text{Cr}$ -gemarkte kankerselle.

SPESIFIEKE LISE (% VAN VOLLEDIGE $^{51}\text{CR}$ VRYSTELLING)				
Kontrole	Oksihumaat 40 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 60 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 80 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 100 $\mu\text{g/ml}$
62.5 $\pm$ 12.4	65.3 $\pm$ 4.4	45.4 $\pm$ 2.2*	53.5 $\pm$ 12.5	38.5 $\pm$ 3.5*

Die resultate word as die gemiddelde waardes  $\pm$  standaardfout van ses herhalings uitgedruk. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

\*  $p < 0.005$

### 5.17 INVLOED VAN OKSIHUMAAT OP DIE MEMBRAAN STABILITEIT VAN SKAAP ERITROSIEETE.

Die effek van oksihumaat (60-200  $\mu\text{g/ml}$ ) op die lise van skaap eritrosiete wat deur 'n bio-aktiewe fosfolipied (LPC) bemiddel is, word in Tabel 3 getoon. Geen statisties betekenisvolle effek ten opsigte van die onbehandelde kontroles, is by enige een van die konsentrasies wat getoets was, waargeneem nie.

**Tabel 3:** Die effek van oksihumaat (60-200  $\mu\text{g/ml}$ ) op lisofosfatidielcholien (LPC)-bemiddelde lise van skaap eritrosiete.

HEMOLISE VAN SKAAPROOIBLOEDSELLE (% VAN VOLLEDIGE LISE)				
Kontrole	Oksihumaat 60 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 80 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 100 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 200 $\mu\text{g/ml}$
39.72 $\pm$ 2.33	43.42 $\pm$ 2.28	41.52 $\pm$ 1.10	41.83 $\pm$ 2.28	40.12 $\pm$ 1.03

Die gemiddelde waardes van vyf herhalings word as % hemolise  $\pm$  standaardfout uitgedruk. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.



## **HOOFTUK 6**

### **BESPREKING**

## 6.1 BESPREGING

### *Inleiding*

Humiensure is natuurlike molekules wat tydens die ontbinding van organiese stowwe gevorm word (Visser, 1982). Hulle besit lokale anti-inflammatoriese, hiperemiese en pynverliggende eienskappe (Motohisa *et al.*, 1973) en kon daarom met sukses as 'n anti-inflammatoriese middel (SALHUMIN®-Jel) gebruik word. Humiensure is ook sistemies aangewend om anemie en hipercholesterolemie te behandel (Soloveyva & Lotosh, 1984). Die antiseptiese eienskappe van veen, wat ryk is aan humiensure, is reeds tydens die Eerste Wêreldoorlog ontdek toe dit direk op oorlogswonde geplaas is om infeksie te voorkom (Haanel, 1924). Humiensure, verkrygbaar onder die handelsnaam Huminit®, word ook al vir baie jare lank gebruik om sooibrand en ander gastriese versteurings te behandel (Kinzlmeier, 1954; Reichert, 1966). Meer onlangs is Von Willebrand siekte behandel met humiensure (Lopez-Fernandez *et al.*, 1992).

'n Suid Afrikaanse maatskappy [Enerkom (Pty) Ltd] het 'n unieke proses ontwikkel om 'n sintetiese vorm van humiensuur wat wateroplosbaar is, naamlik oksihumaat, te sintetiseer (Cronjé *et al.*, 1991). Die belangstelling het ontstaan om moontlike ooreenkomste met die natuurlike humiensure, wat die effektiewe behandeling van 'n verskeidenheid siektetoestande betref, te ondersoek.

Uitgebreide farmakokinetiese en toksikologiese ondersoeke met oksihumaat is *in vivo* uitgevoer. Diere het dosisse van tot 1000 mg/kg oor 'n tydperk van 90 dae ontvang. Geen sterftes van diere as gevolg van die behandeling het voorgekom nie. Alhoewel klein veranderinge in die serum proteïene en hematologiese parameters by diere wat meer as 100 mg/kg ontvang het, waargeneem is, was die enigste betekenisvolle abnormaliteit 'n verhoogde hematokrit by dosisse van 350 mg/kg en hoër en 'n afname in die limfosiëttelling by die 1000 mg/kg vlak [Progress Report: Biocon (Pty) Ltd, Pretoria, Suid Afrika, Julie 1999]. Die hoogste konsentrasie waarvan in hierdie studie gebruik gemaak is, was heelwat laer as die konsentrasies waarby genoemde abnormaliteite waargeneem is.

Verder was die hoogste dosis wat in 'n Fase I kliniese proef toegedien is, 8 g/dag, wat op 'n dosis van 133 mg/kg (in die geval van 'n 60 kg persoon) neerkom (Botes *et al.* in druk).

Volgens 'n farmakokinetiese studie is gevind dat twaalf persent van <sup>123</sup>I-gemerkte oksihumaat wat oraal aan bobbejane toegedien is, in die bloed voorgekom het (Verslag deur: I Dormehl, Atomic Energy Corporation Institute for Life Sciences, Pretoria, Suid Afrika, Desember 1997). Hieruit kan aangeneem word dat 'n betekenisvolle serumvlak van hierdie middel (ongeveer 48 µg/ml in volwasse persone) opgebou sou kon word.

Die moontlike toepassing van steenkoolafkomstige humiensure as 'n antimikrobieese middel vir waterbehandling, is deur Cloete *et al.* (1990) ondersoek terwyl die groei van verskeie mikrobiële patogene effektief deur oksifulviensuur inhibeer is (Van Rensburg *et al.*, 2000). Oksifulviensuur het ook 'n betekenisvolle afname van die inflammatoriese reaksie by diere veroorsaak (Van Rensburg *et al.*, 2001).

#### *Invloed van oksihumaat op limfosietproliferasie*

'n Deeglike studie van die effek van oksihumaat op die immuunsisteem is *in vitro* sowel as *in vivo* uitgevoer. Die resultate om hierdie studies dui daarop dat oksihumaat beskik oor indrukwekkende immuunmodulerende eienskappe *in vitro*. Aanvanklik is vasgestel dat oksihumaat die proliferatiewe reaksie van PHA-gestimuleerde menslike limfosiete, by konsentrasies van 20 µg/ml en hoër, stimuleer het. Hierdie effek is gevind in die geval waar van 'n mengsel van monosiete en limfosiete gebruik gemaak was sowel as monosiet-arme limfosiete ( $p < 0.05$  en  $p \leq 0.001$  respektiewelik). 'n Soortgelyke stimulerende effek van limfosiet-proliferasie is ook deur die natrium sout van 'n kommersiële beskikbare humiensuur verkry, wat aantoon dat hierdie effek nie tot oksihumaat beperk is nie. Die kommersiële beskikbare preparaat is nog nie getoets vir toksisiteit en terapeutiese waarde nie. Die stimulerende effek op proliferasie was selfs meer betekenisvol verhoog in die geval waar limfosiete van HIV-geïnfekteerde individue ondersoek is ( $p < 0.001$ ). HIV-geïnfekteerde individue word met 'n verswakte T-sel proliferasie geassosieer (Meygaard *et al.*, 1993). In hierdie studie is daar gevind dat die limfosiete van hierdie pasiënte duidelik meer vatbaar was vir stimulasie deur oksihumaat as die selle van normale individue wat 'n opwindende bevinding is en aantoon dat hierdie verskynsel wel omkeerbaar is. Die

bevinding dat monosiet-arme limfosiete meer ontvanklik is vir stimulasie deur oksihumaat toon aan dat óf die NADPH oksidase sisteem óf monosiet-afkomstige sitokiene moontlik wel 'n inhiberende effek op die werking van oksihumaat het. Hierdie bevindings behoort verder ondersoek te word. Verder het oksihumaat inhibisie van limfosiet-proliferasie veroorsaak by 10 µg/ml, en ook net by 'n monosiet-ryke limfosiet kultuur. Dit dui weereens daarop dat sitokiene wat deur monosiete geproduseer word moontlik 'n beskermende effek op hierdie selle het. Dit mag ook wees dat verskeie komponente van oksihumaat verskillende effekte op limfosiete het. Verdere studies word beplan om die effek van verskillende oksihumaat komponente op limfosiet-proliferasie te bepaal. Aan die ander kant, indien oksihumaat dalk 'n suurstof-opruimingsaktiwiteit sou besit, sou dit 'n stimulerende effek gehad het op die proliferasie van slegs die monosiet-ryke limfosietmengsel, wat nie die geval was nie. Dit is wel bemoedigend dat die oksihumaat-bemiddelde stimulasie wat verkry is met limfosiete van HIV-geïnfekteerde individue wel in die teenwoordigheid van monosiete plaasgevind het. Hierdie eksperiment is egter nie, weens veiligheidsredes, met monosiet-arme limfosiete herhaal nie en mens kan net spekulêr dat dit selfs meer effektief sou gewees het. Wat baie interessant was, was die bevinding dat oksihumaat ook 'n stimulasie van limfosiet-proliferasie *ex vivo* by HIV-geïnfekteerde individue, wat vir twee weke lank met 4 g oksihumaat per dag behandel is, veroorsaak wat aandui dat die middel wel biobeskikbaar is in die bloed.

#### *Invloed van oksihumaat op IL-2 produksie en CD25 uitdrukking*

Interleukien 2 is 'n belangrike groeifaktor (Abbas *et al.*, 1994) en daar is dus besluit om eerstens uit te vind of die verhoogde proliferasie van behandelde limfosiete nie toegeskryf kan word aan eerstens 'n stimulasie van hierdie groeifaktor en tweedens 'n stimulasie van CD25 wat die reseptor vir IL-2 is. Resultate dui daarop dat die oksihumaat-bemiddelde verhoogde proliferasie wel met 'n verhoogde uitdrukking van die IL-2 reseptor, naamlik CD25 ( $p < 0.05$ ), sowel as met ekstrasellulêre produksie van IL-2 ( $p < 0.05$ ) deur gestimuleerde limfosiete gekorreleer het. CD38 (Gallin & Snyderman, 1999) en HLA-DR ('n molekule wat 'n belangrike rol by selbemiddelde immuniteit speel, was nie deur oksihumaat behandeling geaffekteer nie. Verhoogde uitdrukke van CD38 word geassosieer met HIV infeksies (Gallin & Snyderman, 1999) terwyl verhoogde HLA-DR uitdrukking



verhoog word tydens inflammatoriese reaksies (Gallin & Snyderman, 1999). Die gebrek aan effektiwiteit deur oksihumaat op die uitdrukking van hierdie molekules toon dat oksihumaat 'n selektiewe uitwerking op slegs sekere oppervlakmolekules, naamlik CD25 (word verhoog) en CR3 (word verlaag) het.

Verhoogde IL-2 produksie dui op 'n verhoogde TH<sub>1</sub> aktiwiteit (Abbas *et al.*, 1994). Tydens 'n inflammatoriese reaksie differensieer T-limfosiete in óf TH<sub>1</sub> óf TH<sub>2</sub> selle en beide groepe produseer verskillende tipes sitokiene wat bepaal of die immuunrespons hoofsaaklik sel-bemiddeld (TH<sub>1</sub>) of humoraal-bemiddeld (TH<sub>2</sub>) sal wees (Mosman & Sad, 1996). Stimulasie van 'n TH<sub>1</sub> respons is belangrik om kanker, sowel as virale en opportunistiese infeksies, uit te wis (Peakman & Vergani, 1997). 'n TH<sub>1</sub> respons sal ook die aktiwiteit van TH<sub>2</sub> selle onderdruk en kan moontlik 'n nuwe benadering wees in die behandeling van kroniese, inflammatoriese toestande [soos byvoorbeeld asma, rumatoïede artritis en sistemiese lupus eritmatose (SLE)], waar skadelike antiligggame 'n belangrike rol speel (O'Garra, 1998).

#### *Invloed van oksihumaat op IL-4, IL-6 en IL-10*

Om te bepaal of oksihumaat slegs die stimulasie van sitokiene wat geassosieer is met TH<sub>1</sub> selle stimuleer, is ook bepalings op sitokiene wat geassosieer is met TH<sub>2</sub> selle nl. IL-10, IL-4 en IL-6 gedoen. Oksihumaat het 'n betekenisvolle inhibisie van IL-10 deur gestimuleerde menslike limfosiete veroorsaak ( $p < 0.01$ ), wat die IL-2 resultate ondersteun aangesien IL-10 geassosieer word met die onderdrukking van die produksie van TH<sub>1</sub> geassosieerde sitokiene (Rengarajan *et al.*, 2000).

Produksie van IL-4 deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete, aan die ander kant, was weer statisties betekenisvol deur oksihumaat verhoog ( $p < 0.01$ ), terwyl IL-6 slegs in 'n mindere mate en nie betekenisvol, verhoog is. Net soos IL-10, word hierdie twee sitokiene ook met 'n TH<sub>2</sub> sitokien profiel geassosieer (Rengarajan *et al.*, 2000). Die bevinding dat oksihumaat wel IL-4 produksie kan opreguleer terwyl IL-10 produksie geïnhibeer word, dui daarop dat hierdie verbinding sitokien produksie selektief kan beïnvloed en kan moontlik daaraan toegeskryf word dat, aangesien humiensure so 'n komplekse samestelling het (Stevenson, 1994), daar moontlik verskeie komponente kan wees wat afsonderlik op die

immuunsisteem kan inwerk en sodoende stimulerende effekte op beide selteipes het. 'n Verhoging van IL-4 produksie, wat geassosieer word met humorale immuniteit, sal voordelig wees in die bekamping van infeksies waar spesifieke antiliggame 'n rol speel. Lange *et al.* (1985) het wel 'n verhoging in globulienvlakke by rotte waargeneem na orale toediening van plaagdoders in kombinasie met humiensure wat op 'n stimulasie van die humorale immuunsisteem dui. So ook het Tolpa *et al.* (1983) aangedui dat lae dosisse van 'n peet ekstrak (TTP®) die produksie van immunoglobulene by netbalspelers verhoog het.

Die immuunstimulerende effekte van humiensure is deur Jankowski *et al.* (1993) gedemonstreer. Hierdie navorsers het gevind dat daar, onder pasiënte wat aan herhaalde lugweginfeksies gely het, na behandeling met 'n peetekstrak, betekenisvol minder gevalle van lugweginfeksies voorgekom het. Verder het Zbigniew *et al.* (1993) 'n groep gesonde vrywilligers met dieselfde peetekstrak behandel en 'n verhoogde CD4/CD8 verhouding saam met 'n verhoogde sitotoksiese aktiwiteit van groot granulêre limfosiete waargeneem, alhoewel hy geen verhoogde uitdrukking van IL-2 reseptore gevind het nie. Die rede hiervoor kan moontlik wees omdat hy met gesonde vrywilligers gewerk het met rustende sitokienvlakke.

#### *Invloed van oksihumaat op LTB<sub>4</sub> en PGE<sub>2</sub> produksie*

Omdat LTB<sub>4</sub>, 'n produk van fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), sowel as 5'-lipoksigenase, 'n multifunksionele reguleerder van sitokienproduksie (veral IL-2) is, en omdat dit beide die TH<sub>1</sub> sowel as die TH<sub>2</sub> subpopulasies kan stimuleer (Alonso *et al.*, 1998), is die effek van oksihumaat op LTB<sub>4</sub> getoets. Daar is gevind dat oksihumaat die produksie van LTB<sub>4</sub> deur FMA-gestimuleerde menslike limfosiete statisties betekenisvol verhoog ( $p < 0.05$ ). Dit is egter in teenstelling met die bevinding van Klöcking (1994) wat gevind het dat humiensure die lipoksigenase pad inhibeer. Die enigste verduideliking hiervoor is die komplekse samestelling van die verskillende humiensuurpreparate wat verskillende komponente kan bevat met teenoorgestelde werking op die ensiemsisteme. 'n Studie om die aktiwiteit van verskillende komponente van oksihumaat te ondersoek (wat meganismes insluit), het reeds begin. Die stimulasie van LTB<sub>4</sub> kan egter voordelig wees aangesien dit nie alleen 'n belangrike rol in die induksie van IL-2 produksie speel nie, maar verhoog ook die aktiwiteit

van sitotoksiese T-selle wat 'n moontlike verklaring is vir die verhoging in IL-2 produksie deur oksihumaat-behandelde limfosiete sowel as verhoogde sitotoksiteit van hierdie selle (Arcoleo *et al.*, 1995). Netso kan dit ook 'n rol speel by die stimulerende effek wat oksihumaat op die produksie van TH<sub>2</sub>-geassosieerde sitokienproduksie het (Alonso *et al.*, 1998).

PGE<sub>2</sub> wat, net soos LTB<sub>4</sub>, ook 'n aktiewe afbraakproduk van aragidoonsuur is, se produksie deur oksihumaat behandelde limfosiete, aan die ander kant, is in 'n mindere mate, maar nie betekenisvol, geïnhibeer. PGE<sub>2</sub> besit die vermoë om pyn en koors te induseer. Dit inhibeer T-sel proliferasie deur die produksie van TH<sub>1</sub>-geassosieerde sitokiene (IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  en IL-2) te beperk (Mosman & Coffman, 1989; Hendricks *et al.*, 2000). Alhoewel oksihumaat (tot en met 100  $\mu\text{g/ml}$ ) PGE<sub>2</sub> produksie slegs effens geïnhibeer het, kan 'n verlaagde vlak daarvan moontlik wel bydra tot 'n verhoging in limfosiet proliferasie sowel as die produksie van TH<sub>1</sub>-geassosieerde sitokiene.

Omdat oksihumaat die produksie van LTB<sub>4</sub>, wat geassosieer word met verhoogde sitotoksiese aktiwiteit, deur gestimuleerde limfosiete gestimuleer het, is die effek daarvan op die sitotoksiese aktiwiteit van menslike limfosiete ondersoek. Verder is die anti-tumor eienskappe van humiensure reeds deur Zsindely *et al.* (1971) en Adamek (1976) beskryf. Alhoewel oksihumaat op sy eie die groei van 'n menslike lewer kankersellyn op 'n dosis-afhanklike manier geïnhibeer het, was dit slegs statisties betekenisvol by 'n konsentrasie van 100  $\mu\text{g/ml}$  gewees ( $p < 0.05$ ). Wanneer limfosiete egter by hierdie sisteem gevoeg is, is die mate van inhibisie deur oksihumaat by konsentrasies van 20-100  $\mu\text{g/ml}$ , statisties hoogs betekenisvol verhoog ( $p < 0.005$ ). Hierdie resultate dui op 'n moontlike rol van oksihumaat by die sitotoksiese aktiwiteit van limfosiete en kan moontlik verklaar word deur die verhoging van LTB<sub>4</sub> en IL-2 produksie.

#### *Invloed van oksihumaat op TNF- $\alpha$ en IFN- $\gamma$ produksie*

Die invloed van oksihumaat is ook op die produksie van die pro-inflammatoriese sitokiene TNF- $\alpha$  en IFN- $\gamma$  ondersoek. TNF- $\alpha$  is 'n sitokien wat deur 'n reeks verskillende tipes selle, insluitende NK-selle, sowel as sitotoksiese T limfosiete (CD8<sup>+</sup> selle) geproduseer word en

stimuleer neutrofiële, NK-selle en die uitdrukking van vashegtingsmolekules, terwyl IFN- $\gamma$ , wat deur veral TH<sub>1</sub> limfosiete, NK-selle en makrofage geproduseer word ook pro-inflammatoriese aktiwiteit besit deur die stimulasie van neutrofiële om reaktiewe suurstof spesies te produseer (Huang *et al.*, 1999). In hierdie studie is gevind dat oksihumaat by 20 en 40  $\mu\text{g/ml}$  die produksie van TNF- $\alpha$  deur gestimuleerde limfosiete statisties betekenisvol geïnhibeer het ( $p < 0.05$ ). Geen inhibisie was egter by hoër konsentrasies gevind nie, wat moontlik verklaar kan word deur die komplekse samestelling van hierdie preparaat met verskillende komponente wat mekaar by spesifieke konsentrasies teenwerk. Verder het oksihumaat die produksie van IFN- $\gamma$  deur gestimuleerde limfosiete in 'n mindere mate en nie betekenisvol nie, geïnhibeer. Die moontlikheid bestaan wel dat daar 'n korrelasie tussen hierdie afname en die inhibisie wat met die produksie van TNF- $\alpha$  waargeneem is, bestaan. Laasgenoemde waarneming dui op 'n anti-inflammatoriese aksie deur oksihumaat. In teenstelling met hierdie bevindings het Inglot *et al.* (1999) gevind dat 'n peet ekstrak (Tolpa® Torf Preparation) die produksie van beide hierdie sitokiene kan verhoog. Hierdie peet-afkomstige ekstrak bevat, behalwe humiensure, moontlik verskeie ander komponente met moontlike pro-inflammatoriese eienskappe. 'n Afname in IFN- $\gamma$  kan egter 'n nadelige effek hê indien dit aangewend word vir die behandeling van virus-geïnfekteerde pasiënte (bv HIV pasiënte) aangesien IFN- $\gamma$  anti-virale eienskappe besit (Abbas *et al.*, 1994) en sal dus nie anti-virale middels ondersteun nie.

#### *Invloed van oksihumaat op CR3-uitdrukking en neutrofielvashegting*

Die anti-inflammatoriese aktiwiteit van humiensubstansie en humiensure is reeds deur verskeie navorsers beskryf (Miehlke en Thürigen, 1961; Taugner, 1963; Klöcking *et al.*, 1968; Motohisa *et al.*, 1973; Salz, 1974; Kühnert *et al.*, 1982; Klöcking, 1994; Iubitskaia en Ivanov, 1999). Die inhibisie van TNF- $\alpha$  dui wel daarop dat oksihumaat ook moontlike anti-inflammatoriese eienskappe besit. So byvoorbeeld is TNF- $\alpha$  nodig vir die uitdrukking van die vashegtingsmolekule CR3 (Witko-Sarsat *et al.*, 1999), 'n molekule wat op gestimuleerde neutrofiële uitgedruk word en wat 'n noodsaaklike rol speel by die beskerming van die gasheer teen infektiewe organismes, alhoewel dit ook verantwoordelik is vir neutrofiel-bemiddelde inflammatoriese reaksies (Mukherjee *et al.*, 1998).

Oksihumaat behandeling van menslike neutrofiële het wel tot 'n betekenisvolle afname van

die uitdrukking van die CR3-vashegtingsmolekule gelei. Hierdie betekenisvolle afname in CR3-uitdrukking het by beide FMA- en FMLF-gestimuleerde neutrofiële voorgekom ( $p < 0.0005$  en  $p < 0.05$ , respektiewelik). Aan die anderkant, in die geval van FMA- en FMLF-gestimuleerde neutrofiële, het  $10 \mu\text{g/ml}$  oksihumaat 'n stimulasie van CR3-uitdrukking veroorsaak. Hierdie verskynsel kan moontlik weereens, soos in die geval van die produksie van  $\text{LTB}_4$ , aan die komplekse samestelling van humiensure toegeskryf word. Inhibisie van die CR3-molekule word bevestig deur die oksihumaat-bemiddelde afname in neutrofielvashegting aan 'n oorspronklike baba hamster niersellyn (BHK-21) sowel as aan twee verskillende getransfekteerde BHK-sellyne, naamlik BHK 126-16 (wat menslike E-selektien uitdruk) en BHK 331-7 (wat menslike ICAM-1 uitdruk). Die vashegting van gestimuleerde neutrofiële aan al drie sellyne was betekenisvol geïnhibeer ( $p < 0.05$ ), maar in die geval van die BHK 331-7 was die inhibisie by oksihumaatkonsentrasies van  $40\text{-}100 \mu\text{g/ml}$  statisties hoogs betekenisvol ( $p < 0.0001$ ). Oksihumaat het wel, tussen  $10\text{-}40 \mu\text{g/ml}$ , stimulasie van die vashegting van rustende neutrofiële aan al drie sellyne veroorsaak. Dit kan moontlik verduidelik word deur 'n verhoogde uitdrukking van CR3, soos gevind is by rustende neutrofiële, alhoewel hierdie verhoging nie betekenisvol was in die kort (15 minute) blootstellingstydperk wat in hierdie studie gebruik is nie. Gau et al. (2000) het gevind dat humiensuur proteïen sintese inhibeer met gevolglike inhibisie van die adhesie molekules, ICAM-1, VCAM-1 en E-selektien. Hierdie inhibisie korreleer wel met die inhibisie van  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , wat moontlik ook 'n rol kan speel by die uitdrukking van CR3.

#### *Invloed van oksihumaat op NK-sel aktiwiteit*

Oksihumaat het 'n inhiberende effek op die aktiwiteit van NK-selle gehad, alhoewel dit slegs by  $60$  en  $100 \mu\text{g/ml}$ , maar nie by  $80 \mu\text{g/ml}$ , betekenisvol was. Verdere eksperimente mag egter nodig wees om betekenisvolheid aan te toon. Aangesien NK-selle  $\text{IFN-}\gamma$  vir optimale funksie benodig (Timonen *et al.*, 1982) en aangesien oksihumaat geen betekenisvolle effek op die produksie daarvan gehad het nie, is dit 'n moontlike rede waarom NK-sel aktiwiteit nie verhoog het nie. Die inhibisie van NK-selaktiwiteit moet verder ondersoek word. Die moontlikheid bestaan dat oksihumaat dalk noodsaaklike vashegtingsmolekules, nodig vir binding van NK-selle aan die teiken selle, inhibeer.

### *Invloed van oksihumaat op neutrofiel degranulasie*

Degranulasie van fagosiete kan lei tot die vrystelling van pro-inflammatoriese ensieme en word geassosieer met die uitdrukking van CR3 op die oppervlakte van gestimuleerde fagosiete (Mukherjee *et al.*, 1998). Net soos neutrofiële, speel eosinofiele ook 'n regulerende funksie in immuunresponse (Egsten *et al.*, 1998) maar is ook belangrik by inflammatoriese allergieë (Gallin *et al.*, 1992). Om hierdie redes is besluit om die moontlike inhiberende aktiwiteit van oksihumaat op die degranulasie van gestimuleerde neutrofiële en eosinofiele te ondersoek. Oksihumaat het die vrystelling van MPO (deur neutrofiële) en EKP (deur eosinofiele) op 'n dosis-afhanklike manier geïnhipeer wanneer van 'n opgelosde, maar nie 'n gepartikuleerde stimulant, gebruik gemaak word. Hierdie resultate dui ook op 'n anti-inflammatoriese funksie van oksihumaat wat effektief behoort te wees ook in die geval van 'n allergiese respons, terwyl oksihumaat geen beskermende aktiwiteit op geopsoneerde patogene behoort te hê nie.

### *Invloed van oksihumaat op selmembrane van skaaprooibloedselle*

Verdere meganistiese studies was daarop gerig om te bepaal of die effek van oksihumaat op die selle van die immuunsisteem nie weens 'n direkte destabiliseringseffek op selmembrane is nie. Skaaprooibloedselle is gebruik as sensitiewe indikator sisteem (Anderson *et al.*, 1996). Oksihumaat het geen effek op die lise van hierdie selle gehad nie.

### *Oksihumaat as moontlike behandeling vir HIV*

Die groot verlies van CD4<sup>+</sup> selle by HIV-geïnfekteerde individue, lei tot 'n verlies van sellulêre immuun funksies (Losso *et al.*, 2000). Interleukien 2, wat deur T-selle geproduseer word, se funksie is om die groei en rypwording van T-selle te bevorder. Alhoewel IL-2 nie virale replikasie *in vitro* (Kovacs *et al.*, 1996) verminder nie, mag dit egter die virus-geïnduseerde verlies van CD4<sup>+</sup> selle by HIV-geïnfekteerde persone teenwerk deur die proliferasie van T-selle te verhoog. Die vermoë van sommige HIV-geïnfekteerde individue om normale TH<sub>1</sub> tipe respons in stand te hou, bied lang termyn beskerming aan hierdie pasiënte sodat hulle lewe verleng word, aangesien progressie van die siekte afhanklik is van 'n TH<sub>1</sub> na 'n TH<sub>2</sub> sitokien verskuiwing. Interleukien 2, wat in kombinasie met 'n retrovirale behandeling (HAART) toegedien word, veroorsaak 'n

dramatiese verhoging in CD4<sup>+</sup> getalle in vergelyking met HAART-behandeling alleen (Shearer & Clerici, 1998; Davey *et al.*, 2000). Die stimulasie van IL-2 produksie kan dus 'n verneme bydrae lewer om die pasiënt te help om opportunistiese infeksies te kan hanteer. Wat egter in ag geneem moet word is dat 'n verhoging van IL-2 saam met 'n verhoging van CD4<sup>+</sup> selle ook 'n verhoging van virale groei tot gevolg kan hê (Davey *et al.*, 2000). Die toediening van IL-2 aan HIV-geïnfekteerde pasiënte moet dus saam met anti-retrovirale middels (HAART) toegedien word (Davey *et al.*, 2000). Oksihumaat, aan die ander kant, besit ook direkte anti-virale aktiwiteit (Van Rensburg *et al.*, 2002) en kan moontlik as enkel-middel terapie vir HIV-geïnfekteerde pasiënte oorweeg word.

Na aanleiding van hierdie bevindings is 'n Fase I studie met oksihumaat in HIV-geïnfekteerde persone aangepak (Botes *et al.* in druk). Resultate verkry uit hierdie studie toon dat oksihumaat, tot op 'n dosis van 8 g/dag, geen nadelige effek op enige biochemiese of hematologiese parameters van die pasiënte gehad het nie. Alhoewel die virus lading en CD4<sup>+</sup> tellings nie noemenswaardig tussen die behandelde en plasebo groepe verskil het nie, het die liggaamsgewig van hierdie groepe betekenisvol gestyg, wat wel aandui dat hierdie middel 'n positiewe effek op die pasiënte gehad het. Die kliniese proef was hoofsaaklik beplan om te bepaal of hierdie middel enigsins 'n nadelige effek op die pasiënte het en het slegs oor twee weke gestrek, wat nie lank genoeg is om enige verbetering in effektiwiteitsmerkers (CD4 tellings en virus lading) te verwag nie.

### **Samevatting:**

#### *Oksihumaat is nie toksies nie*

Geen betekenisvolle toksisiteite onder 350 mg/kg is by eksperimentele diere, wat aan oksihumaat blootgestel is, waargeneem nie [Progress Report: Biocon (Pty) Ltd, Pretoria, Suid Afrika, Julie 1999]. Dit het ook geen meetbare toksiese effekte op HIV-geïnfekteerde individue, wat vir twee weke lank orale dosisse van tot 8 g per dag geneem het, gehad nie. Hierdie waarnemings stem ooreen met studies wat voorheen op humiensure uitgevoer is (Golbs *et al.*, 1982; Kühnert *et al.*, 1989).

*Oksihumaat besit immuunstimulerende eienskappe*

Volgens hierdie studie is gevind dat oksihumaat die produksie van LTB<sub>4</sub>, IL-2, IL-4, sowel as die sitotoksiese aktiwiteit van limfosiete stimuleer.

*Oksihumaat besit anti-inflammatoriese eienskappe*

Volgens hierdie studie is gevind dat oksihumaat neutrofiel vashegting en die degranulasie van neutrofiële en eosinofiele inhibeer.

Hierdie kombinasie van bogenoemde eienskappe in een middel blyk uniek te wees en behoort verder ondersoek te word vir die behandeling van pasiënte met immuun-abnormaliteite.

*Toekomstige navorsing*

Die anti-inflammatoriese en immuunstimulerende eienskappe van oksihumaat moet verder ondersoek word deur kliniese proewe op pasiënte met inflammatoriese siektes, bv. rumatoïede artritis, en infektiewe siektes, bv. tuberkulose, te beplan. Kombinasie behandeling van HIV geïnfekteerde pasiënte met antiretrovirale middels plus oksihumaat, moet ook sterk oorweeg word.